This is a digital copy of a book that was preserved for generations on library shelves before it was carefully scanned by Google as part of a project to make the world's books discoverable online.

It has survived long enough for the copyright to expire and the book to enter the public domain. A public domain book is one that was never subject to copyright or whose legal copyright term has expired. Whether a book is in the public domain may vary country to country. Public domain books are our gateways to the past, representing a wealth of history, culture and knowledge that's often difficult to discover.

Marks, notations and other marginalia present in the original volume will appear in this file - a reminder of this book's long journey from the publisher to a library and finally to you.

Usage guidelines

Google is proud to partner with libraries to digitize public domain materials and make them widely accessible. Public domain books belong to the public and we are merely their custodians. Nevertheless, this work is expensive, so in order to keep providing this resource, we have taken steps to prevent abuse by commercial parties, including placing technical restrictions on automated querying.

We also ask that you:

+ *Make non-commercial use of the files* We designed Google Book Search for use by individuals, and we request that you use these files for personal, non-commercial purposes.
+ *Refrain from automated querying* Do not send automated queries of any sort to Google's system: If you are conducting research on machine translation, optical character recognition or other areas where access to a large amount of text is helpful, please contact us. We encourage the use of public domain materials for these purposes and may be able to help.
+ *Maintain attribution* The Google "watermark" you see on each file is essential for informing people about this project and helping them find additional materials through Google Book Search. Please do not remove it.
+ *Keep it legal* Whatever your use, remember that you are responsible for ensuring that what you are doing is legal. Do not assume that just because we believe a book is in the public domain for users in the United States, that the work is also in the public domain for users in other countries. Whether a book is still in copyright varies from country to country, and we can't offer guidance on whether any specific use of any specific book is allowed. Please do not assume that a book's appearance in Google Book Search means it can be used in any manner anywhere in the world. Copyright infringement liability can be quite severe.

About Google Book Search

Google's mission is to organize the world's information and to make it universally accessible and useful. Google Book Search helps readers discover the world's books while helping authors and publishers reach new audiences. You can search through the full text of this book on the web at `http://books.google.com/`

A propos de ce livre

Ceci est une copie numérique d'un ouvrage conservé depuis des générations dans les rayonnages d'une bibliothèque avant d'être numérisé avec précaution par Google dans le cadre d'un projet visant à permettre aux internautes de découvrir l'ensemble du patrimoine littéraire mondial en ligne.

Ce livre étant relativement ancien, il n'est plus protégé par la loi sur les droits d'auteur et appartient à présent au domaine public. L'expression "appartenir au domaine public" signifie que le livre en question n'a jamais été soumis aux droits d'auteur ou que ses droits légaux sont arrivés à expiration. Les conditions requises pour qu'un livre tombe dans le domaine public peuvent varier d'un pays à l'autre. Les livres libres de droit sont autant de liens avec le passé. Ils sont les témoins de la richesse de notre histoire, de notre patrimoine culturel et de la connaissance humaine et sont trop souvent difficilement accessibles au public.

Les notes de bas de page et autres annotations en marge du texte présentes dans le volume original sont reprises dans ce fichier, comme un souvenir du long chemin parcouru par l'ouvrage depuis la maison d'édition en passant par la bibliothèque pour finalement se retrouver entre vos mains.

Consignes d'utilisation

Google est fier de travailler en partenariat avec des bibliothèques à la numérisation des ouvrages appartenant au domaine public et de les rendre ainsi accessibles à tous. Ces livres sont en effet la propriété de tous et de toutes et nous sommes tout simplement les gardiens de ce patrimoine. Il s'agit toutefois d'un projet coûteux. Par conséquent et en vue de poursuivre la diffusion de ces ressources inépuisables, nous avons pris les dispositions nécessaires afin de prévenir les éventuels abus auxquels pourraient se livrer des sites marchands tiers, notamment en instaurant des contraintes techniques relatives aux requêtes automatisées.

Nous vous demandons également de:

+ *Ne pas utiliser les fichiers à des fins commerciales* Nous avons conçu le programme Google Recherche de Livres à l'usage des particuliers. Nous vous demandons donc d'utiliser uniquement ces fichiers à des fins personnelles. Ils ne sauraient en effet être employés dans un quelconque but commercial.

+ *Ne pas procéder à des requêtes automatisées* N'envoyez aucune requête automatisée quelle qu'elle soit au système Google. Si vous effectuez des recherches concernant les logiciels de traduction, la reconnaissance optique de caractères ou tout autre domaine nécessitant de disposer d'importantes quantités de texte, n'hésitez pas à nous contacter. Nous encourageons pour la réalisation de ce type de travaux l'utilisation des ouvrages et documents appartenant au domaine public et serions heureux de vous être utile.

+ *Ne pas supprimer l'attribution* Le filigrane Google contenu dans chaque fichier est indispensable pour informer les internautes de notre projet et leur permettre d'accéder à davantage de documents par l'intermédiaire du Programme Google Recherche de Livres. Ne le supprimez en aucun cas.

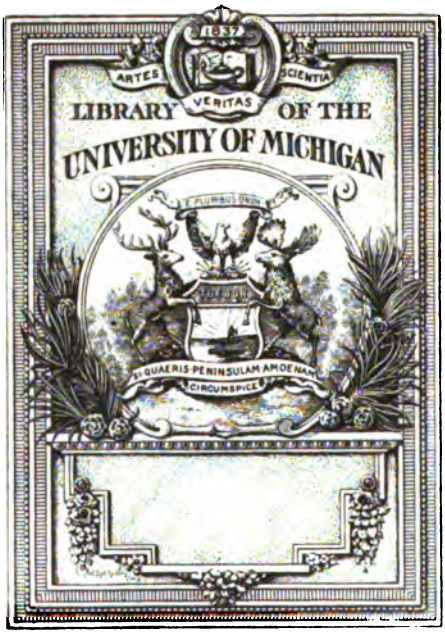
+ *Rester dans la légalité* Quelle que soit l'utilisation que vous comptez faire des fichiers, n'oubliez pas qu'il est de votre responsabilité de veiller à respecter la loi. Si un ouvrage appartient au domaine public américain, n'en déduisez pas pour autant qu'il en va de même dans les autres pays. La durée légale des droits d'auteur d'un livre varie d'un pays à l'autre. Nous ne sommes donc pas en mesure de répertorier les ouvrages dont l'utilisation est autorisée et ceux dont elle ne l'est pas. Ne croyez pas que le simple fait d'afficher un livre sur Google Recherche de Livres signifie que celui-ci peut être utilisé de quelque façon que ce soit dans le monde entier. La condamnation à laquelle vous vous exposeriez en cas de violation des droits d'auteur peut être sévère.

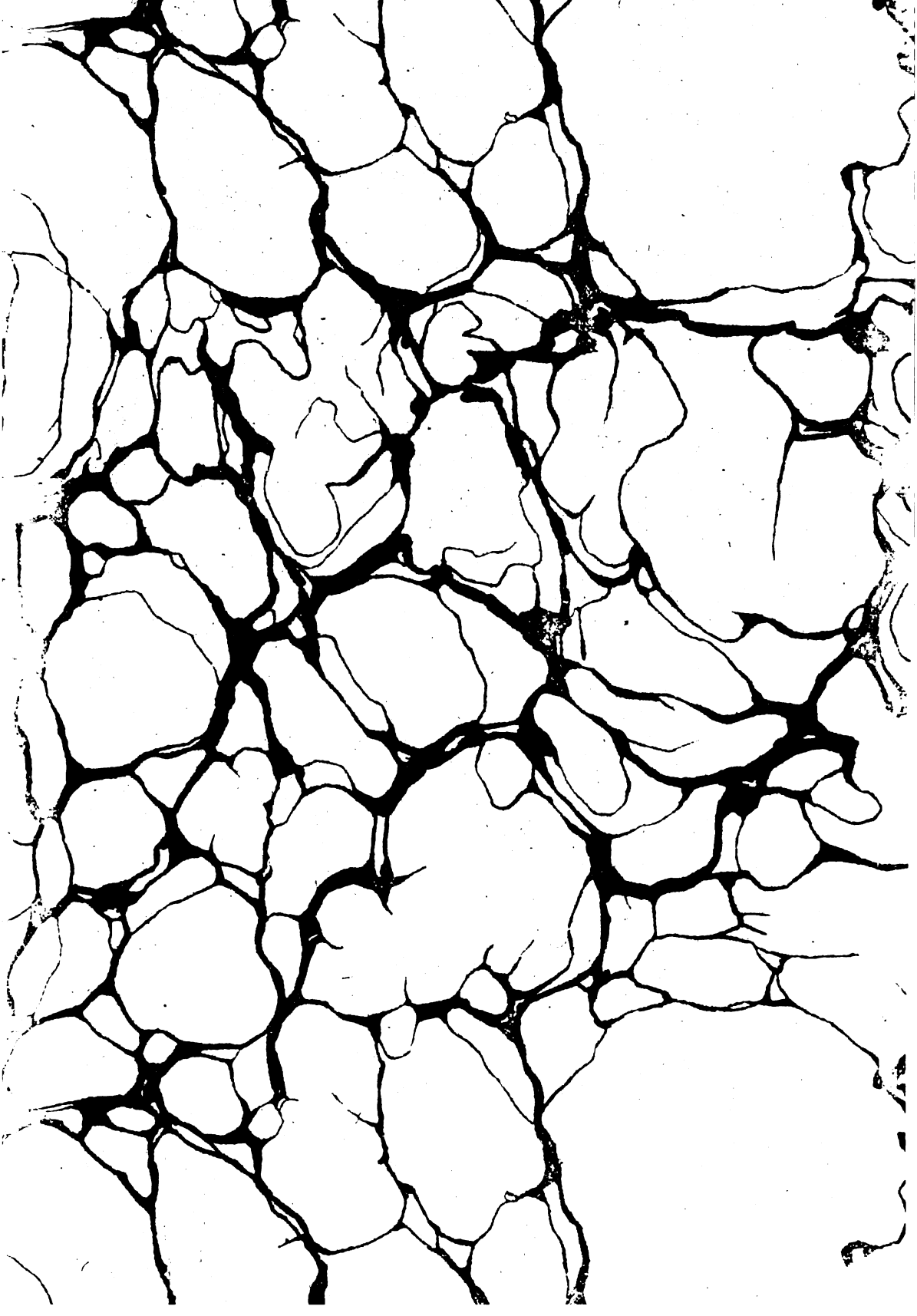
À propos du service Google Recherche de Livres

En favorisant la recherche et l'accès à un nombre croissant de livres disponibles dans de nombreuses langues, dont le français, Google souhaite contribuer à promouvoir la diversité culturelle grâce à Google Recherche de Livres. En effet, le Programme Google Recherche de Livres permet aux internautes de découvrir le patrimoine littéraire mondial, tout en aidant les auteurs et les éditeurs à élargir leur public. Vous pouvez effectuer des recherches en ligne dans le texte intégral de cet ouvrage à l'adresse `http://books.google.com`

B 484869

UNIV. OF MICH.


1837
ARTES
VERITAS
SCIENTIA
LIBRARY OF THE
UNIVERSITY OF MICHIGAN
E PLURIBUS UNUM
SI QUAERIS PENINSULAM AMOENAM
CIRCUMSPICE



SCIENCE LIBRARY
QK
569
.C6
A24

UNIVERSITÉ DE GENÈVE. — INSTITUT BOTANIQUE. — PROF. R. CHODAT
6e SÉRIE, VIIe FASCICULE

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

SUR LA

Physiologie de quelques Algues vertes.

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

par

Minko ADJAROF

GENÈVE
LIBRAIRIE HENRY KÜNDIG
Libraire de l'Institut.
11, Corraterie, 11

1905

La Faculté des Sciences, sur le préavis de M. le Prof. Chodat, autorise l'impression de la thèse présentée par M. Minko Adjarof, intitulée « Recherches expérimentales sur la physiologie de quelques algues vertes, » sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 20 décembre 1904.

Le Doyen :
R. CHODAT.

If an instance in which the phenomenon under investigation occurs, and an instance in which it does not occur, have every circumstance in common save one, that one occurring only in the former: the circumstance in which alone the two instances differ, is the effect, or the cause, or an indispensable part of the cause, of the phenomenon.

STUART MILL.

INTRODUCTION [1]

Depuis longtemps les plantes inférieures et, plus spécialement les algues vertes, par leur facilité de se prêter aux expérimentations les plus variées, ont attiré l'attention des botanistes, soit au point de vue des conditions de nutrition, soit au point de vue des relations entre la nutrition et les modifications de la morphologie externe et interne, soit enfin par la très haute importance que ces petits organismes présentent pour expliquer la notion de l'espèce. Nous avons étudié à notre tour la physiologie expérimentale de *Stichococcus minor* Braun, mais nos recherches n'épuisent pas complètement la question. Nous avons choisi surtout les points qui nous semblaient les plus importants au point de vue de la physiologie botanique expérimentale qui s'est

[1] Ce travail a été fait sur le conseil et sous la direction de Monsieur le Professeur Chodat dans le laboratoire de physiologie de l'Institut de botanique de l'Université de Genève. Nous tenons à lui témoigner ici notre reconnaissance pour la bienveillante attention avec laquelle il a suivi nos recherches.

262692

prêtée depuis quelques années à de nombreuses discussions.

Des expériences plus ou moins précises ont démontré d'une part que la peptone, composé azoté, peut constituer un aliment complet pour la nutrition de certaines algues inférieures. provenant de lichens, d'autre part que l'organisme, passant au saprophytisme, la diminution dans l'intensité de la lumière n'influerait pas sur son développement normal. Nous avons voulu, par conséquent, savoir quels résultats donnerait l'expérimentation sur *Stichococcus minor* à ces deux points de vue :

1° Relations entre le saprophytisme et la nutrition de *Stichococcus minor* et 2° L'influence de la lumière sur le développement du même organisme.

Mais ayant trouvé que les gonidies des lichens sécrètent généralement des ferments protéolytiques (diastases) et liquéfient les milieux gélatinisés, nous avons cherché quel serait le rapport entre ce pouvoir liquéfiant et les conditions chimiques et physiques. Aux deux premiers points nous avons ajouté par conséquent ce troisième :

3° Relations entre le pouvoir liquéfiant de *Stichococcus minor* et les conditions chimiques et physiques dans lesquelles il vit.

Nous avons opéré en outre avec *Protococcus* sp., *Dictyosphærium puchellum* Woolle, et les gonidies de *Solorina crocea*[1].

[1] Les algues que nous avons expérimentées n'ont pas encore été com-

Un autre point qui, à notre sens, est peut-être aussi important que les trois précédents et qui mérite la même attention, c'est la signification des sels minéraux sur le développement de *Stichococcus minor*. A notre connaissance, on a très peu expérimenté dans cette direction et notamment on n'a jamais essayé de supprimer complètement les sels minéraux qu'on trouve habituellement dans le suc cellulaire et de les remplacer par d'autres, par exemple par des sels organiques, etc.

Le problème dans ce sens est très vaste et on devrait, pour arriver à des résultats complets, expérimenter pendant un temps très long que nous n'avions pas à notre disposition. C'est pourquoi nous n'avons fait porter nos recherches que sur la valeur nutritive du potassium et du calcium, qu'on classe parmi les éléments nécessaires que l'on rencontre dans toutes les cendres des plantes. En effet, le potassium accompagne toujours les hydrates de carbone et de ce fait on suppose qu'il facilite leur déplacement. Le calcium est surtout nécessaire pour le développement normal des feuilles : les plantes sans chlorophylle, comme par exemple, les champignons, peuvent se passer de *Ca*. Dans nos recherches sur cette question, nous sommes allé jusqu'à supprimer complètement les sels minéraux et nous nous sommes servi de solutions qui renfermaient les éléments nécessaires pour la formation du protoplasme, sous forme de

plètement étudiées au point de vue morphologique et systématique. *Protococcus* sp. et les gonides de *Solorina* n'ont pas encore reçu de nom définitif; elles feront l'objet d'une publication ultérieure de M. le Prof. Chodat.

sels organiques. Nous nous sommes posé le problème de la façon suivante : si la plante peut se passer de sels minéraux dans les conditions de nos expériences, c'est parce qu'ils ne sont pas absolument nécessaires et si d'autre part, on les trouve toujours présents dans le suc cellulaire des plantes développées librement dans la nature, c'est parce qu'elles n'en ont pas d'autres à leur disposition ; mais si la plante ne peut pas se passer des sels minéraux qu'on trouve toujours dans leurs cendres, c'est parce qu'ils jouent un rôle sensibilisateur et que par conséquent les réactions chimiques intracellulaires ne pourraient se produire qu'en leur présence.

C'est par ces dernières recherches que nous avons commencé. Nos expériences sur ce point ont porté aussi sur *Chlorella vulgaris* qui se prête très bien à toutes sortes d'expériences.

* * *

On sait déjà, par les travaux de plusieurs auteurs, qu'une culture qui renferme d'autres organismes que l'espèce à étudier, des bactéries par exemple, ne peut jamais donner des résultats certains. Les conditions choisies pour le développement d'une espèce peuvent ne pas convenir pour le développement d'une autre. Cette dernière, troublant le milieu afin que les conditions deviennent favorables pour elle, empêche le développement normal de la première. Pour ne pas arriver à des déductions fausses, nous devions donc opérer avec

des espèces absolument pures ; il fallait par conséquent isoler les algues que nous étudiions et les séparer de tout organisme étranger. Ce travail long et compliqué nous a été épargné grâce à la complaisance de M. le Professeur Chodat, qui a mis à notre disposition les nombreuses algues qu'il cultive à l'état pur depuis plusieurs années à l'Institut botanique de l'Université de Genève. Nous avons pu constater sous le microscope leur pureté absolue.

Nous tenons ici à exprimer à M. Chodat notre vive reconnaissance pour le matériel qu'il nous a communiqué et pour les nombreux conseils qu'il n'a jamais cessé de nous prodiguer.

CHAPITRE PREMIER

Valeur nutritive du Potassium et du Calcium.

Sommaire. — § 1. Cultures dans la solution de Detmer : *a)* Renfermant le potassium et le calcium ; *b)* Ne renfermant que le calcium ; *c)* Ne renfermant que le potassium. § 2. Cultures dans des tubes à parois paraffinées : *a)* La solution de Detmer renferme le potassium et le calcium ; *b)* Elle ne renferme que le potassium ; *c)* Elle ne renferme que le calcium. § 3. Cultures dans une solution contenant des sels ammoniacaux.

Pour préciser l'importance du rôle que jouent les sels de potassium et de calcium dans la nutrition de *Stichococcus* et de *Chlorella,* nous avons entrepris, le 18 février 1902, une série d'expériences que nous allons exposer dans ce qui va suivre. Les milieux que nous avons utilisés sont des milieux liquides ; pour point de départ nous avons choisi la solution de Detmer [1], dont voici la formule :

[1] Voir les indications bibliographiques à la fin de ce travail.

Nitrate de calcium	1	gr.
Chlorure de potassium . . .	0,25	»
Sulfate de magnésium . . .	0,25	»
Phosphate acide de potassium	0,25	»
Chlorure ferrique	des traces.	
Un litre d'eau distillée.		

Mais ayant voulu trouver en même temps le maximum de concentration du milieu où ces algues se développent encore, nous avons modifié cette formule en multipliant les quatre premiers sels par 57,5. Ainsi, nous avons préparé une solution mère à 10 %.

§ 1. Cultures dans la solution de Detmer.

a) *La solution renferme le potassium et le calcium.*

A partir de cette solution de Detmer très concentrée, nous avons établi par dilution des séries à concentrations différentes, depuis 1 ‰ jusqu'à 10 %. Voici les séries que nous avons ensemencées avec *Stichococcus*, le 18 février 1902, après stérilisation du milieu, et dont nous avons suivi jour après jour le développement.

1.	quatre	éprouvettes	renferment	la	solution	à	1 ‰
2.	»	»	»	»	»	à	2 »
3.	»	»	»	»	»	à	3 »
4.	»	»	»	»	»	à	5 »

5.	quatre	éprouvettes	renferment	la	solution	à 8 ‰
6.	»	»	»	»	»	à 10 »
7.	»	»	»	»	»	à 2 %
8.	»	»	»	»	»	à 3 »
9.	»	»	»	»	»	à 4 »
10.	»	»	»	»	»	à 5 »
11.	»	»	»	»	»	à 6 »
12.	»	»	»	»	»	à 7 »
13.	»	»	»	»	»	à 8 »
14.	»	»	»	»	»	à 9 »
15.	»	»	»	»	»	à 10 »

Pour que le développement devienne visible à l'œil nu, il faut quelques jours seulement. Au bout du dixième jour, on peut déjà apercevoir l'algue, notamment dans les solutions les moins concentrées. Il faut attendre encore cinq jours pour que le développement commence dans les milieux contenant 2 à 6 % de sel; aucun développement ne se manifeste dans les solutions plus concentrées.

b) *La solution ne renferme que le calcium.*

Pour expérimenter la valeur du potassium, le chlorure de potassium était remplacé dans la solution mère par la même quantité de chlorure de sodium, le phosphate acide de potassium, par du phosphate de sodium (Na_3PO_4). Les séries étaient absolument les mêmes que dans le cas précédent et les cultures furent commencées à la même date pour pouvoir être comparées.

Le résultat ici est différent du premier quant aux dates où l'on peut observer le commencement du développement de l'algue. Ainsi ce n'est plus au bout du dixième jour, mais bien du septième que l'on peut déjà apercevoir les organismes dans la solution qui ne renferme que 5 ‰ de sels, tandis que dans les autres milieux on ne remarque absolument rien encore à cette date. Dans la solution à 2 ‰, le développement commence au bout du dixième jour. C'est après 13 jours seulement à partir de la date de l'inoculation qu'on voit l'algue partout développée : *le développement a lieu dans tous les milieux de la série.*

c) *La solution ne renferme que le potassium.*

Pour les expériences concernant le calcium, nous avons fait également dans la solution-mère une substitution de la façon suivante : Le nitrate de calcium a été remplacé par le nitrate de potassium. Nous avons établi les mêmes séries que dans les deux expériences précédentes et nous les avons commencées à la même date.

Les résultats ici sont identiques à ceux obtenus dans la solution complète de Detmer, si l'on considère le commencement du développement.

En comparant ultérieurement le développement de l'algue dans ces trois sortes d'expériences, on constate qu'il varie suivant les solutions. C'est dans la solution de Detmer complète qu'il est le plus fort, mais il diminue successivement et d'une manière absolument régu-

lière avec l'augmentation de la concentration du milieu. Dans la série de solution sans potassium, *Stichococcus* se développe encore assez fortement, mais de façon toujours beaucoup moins intense que dans les solutions normales, et cela d'une manière absolument irrégulière : *il n'y a ni diminution, ni augmentation du développement*. Enfin, dans la série de solution sans calcium, quoique le développement soit *moins intense que dans les solutions normales*, on remarque néanmoins la même régularité dans la diminution de l'intensité, au fur et à mesure que la concentration des milieux augmente.

Quant au point maximum de concentration, l'algue arrête son développement à 6 % pour les solutions normales et pour celles qui ne renferment pas de calcium, *mais dans les solutions sans potassium, elle se développe partout : l'excès de potassium agit donc comme poison.*

Parallèlement avec *Stichococcus*, les mêmes séries ont été établies à la même date pour *Chlorella vulgaris*. Nous avons obtenu des résultats tout différents de ceux de *Stichococcus*. Nous jugeons nécessaire de les exposer ici précisément parce qu'ils montrent clairement les diverses manières de se comporter des organismes vis-à-vis des mêmes conditions d'expérience.

Il est à remarquer tout d'abord que *Chlorella* se développe dans les mêmes conditions beaucoup plus vigoureusement que *Stichococcus*. En outre, un temps plus court est nécessaire pour que son développement commence : dans toutes les solutions et au bout du

septième jour, on peut observer déjà l'algue à l'œil nu. Mais ici un fait très intéressant est à relever : Pour les solutions complètes et pour celles qui ne renferment pas de potassium, les résultats confirment ceux que nous avons obtenus pour *Stichococcus;* mais ce n'est pas le cas pour les solutions sans calcium. Dans ce dernier cas, le résultat diffère totalement : *le développement est non seulement incomparablement plus fort, que dans les autres solutions, mais il augmente fortement avec la concentration du milieu: plus le milieu est concentré, plus l'algue est vigoureusement développée.* De cette observation on pourrait tirer la conclusion que, pour *Chlorella*, contrairement à ce qui a lieu pour *Stichococcus, c'est uniquement le potassium qui est indispensable.* Le calcium ne servirait que comme régularisateur pour empêcher le développement; quand on le supprime, l'algue, se trouvant affranchie de cette condition défavorable, continue à vivre de façon très vigoureuse.

Ces trois sortes d'expériences pour *Stichococcus* et pour *Chlorella* ont été répétées trois fois et nous avons toujours obtenu les mêmes résultats.

Les tableaux comparatifs suivants nous donnent une idée claire de tout ce que nous avons dit jusqu'ici. Ces deux tableaux nous indiquent le nombre de jours nécessaires pour le commencement du développement et les points maximum de concentration, le premier pour *Stichococcus* et le deuxième pour *Chlorella.*

I. — STICHOCOCCUS

SOLUTION DE DETMER															
Concentr. du milieu.	1°/oo	2°/oo	3°/oo	5°/oo	8°/oo	10°/oo	2°/o	3°/o	4°/o	5°/o	6°/o	7°/o	8°/o	9°/o	10°/o
Nombre de jours.	10	10	10	10	10	10	15	15	15	15	15	—	—	—	—

SOLUTION DE DETMER SANS POTASSIUM															
Concent. du milieu	1°/oo	2°/oo	3°/oo	5°/oo	8°/oo	10°/oo	2°/o	3°/o	4°/o	5°/o	6°/o	7°/o	8°/o	9°/o	10°/o
Nombre de jours.	13	10	13	7	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13

SOLUTION DE DETMER SANS CALCIUM															
Concentr. du milieu.	1°/oo	2°/oo	3°/oo	5°/oo	8°/oo	10°/oo	2°/o	3°/o	4°/o	5°/o	6°/o	7°/o	8°/o	9°/o	10°/o
Nombre de jours.	10	10	10	10	10	10	15	15	15	15	15	—	—	—	—

II. — CHLORELLA

SOLUTION DE DETMER															
Concentr. du milieu.	1°/oo	2°/oo	3°/oo	5°/oo	8°/oo	10°/oo	2°/o	3°/o	4°/o	5°/o	6°/o	7°/o	8°/o	9°/o	10°/o
Nombre de jours.	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	—	—	—	—

SOLUTION DE DETMER SANS POTASSIUM															
Concentr. du milieu.	1°/oo	2°/oo	3°/oo	5°/oo	8°/oo	10°/oo	2°/o	3°/o	4°/o	5°/o	6°/o	7°/o	8°/o	9°/o	10°/o
Nombre de jours.	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	—	—	—	—

SOLUTION DE DETMER SANS CALCIUM															
Concentr. du milieu.	1°/oo	2°/oo	3°/oo	5°/oo	8°/oo	10°/oo	2°/o	3°/o	4°/o	5°/o	6°/o	7°/o	8°/o	9°/o	10°/o
Nombre de jours.	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

§ 2. CULTURES DANS DES TUBES A PAROIS PARAFFINÉES.

Comme on le voit par les expériences précédentes, c'est une toute petite quantité de sels qui est nécessaire pour la nutrition de ces petits organismes, car à 1 °/oo le développement est encore assez fort et particulièrement pour *Stichococchus*, plus on diminue la concentration, mieux il se développe. Pour cette raison, nous nous sommes demandé si le verre ne peut pas être dissout par l'eau distillée et procurer ainsi, quoiqu'en quantité infinitésimale, une nourriture suffisante. Dans ce but nous avons ensemencé *Stichococchus* dans quatre flacons d'Erlenmayer, au préalable soigneusement lavés et essuyés, ne renfermant que de l'eau distillée. Au bout de 15 jours, comme nous ne remarquions aucune trace de développement, même en regardant à la loupe, nous avons supposé que la question était tranchée; mais ayant attendu encore une dizaine de jours, nous avons constaté alors que l'algue se développe quand même. L'eau distillée dissout par conséquent le verre et les résultats que nous avions déjà obtenus ne pouvaient être que relatifs. Il fallait chercher une autre méthode qui permettrait la réalisation d'expériences plus exactes, et par laquelle on ferait en sorte que l'eau ne touchât pas le verre. C'est à la méthode que nous appelons *méthode de paraffinage* que nous avons eu recours. Elle nous a été indiquée par M. le professeur Chodat qui l'avait expéri-

mentée à propos de recherches encore inédites. Je tiens à l'exposer ici en quelques mots.

Méthode de paraffinage.

Cette méthode comprend trois opérations différentes. La première consiste dans la préparation de tubes à réaction à parois paraffinées; la seconde dans la préparation d'un ballon à parois également paraffinées et enfin la troisième qui consiste dans la distillation de l'eau.

Pour effectuer la première opération, on procède de la façon suivante : On prend quelques dizaines de tubes à réaction et on les lave soigneusement de façon à ce que leurs parois soient dépourvues de toute substance minérale et de tout corps gras. La suppression de ces derniers est absolument nécessaire, car si on en laissait subsister, la fixation de la paraffine ne se ferait pas bien, de sorte que dans la suite il en résulterait des difficultés très grandes sur lesquelles nous reviendrons plus loin. Ensuite on prend un morceau de paraffine dont la surface est soigneusement nettoyée au couteau pour éviter les substances étrangères qui s'y sont collées et on le fond. Cette paraffine est distribuée dans les tubes déjà préparés. Dans chacun il doit y en avoir une quantité suffisante pour pouvoir obtenir sur toute la surface du verre une couche assez épaisse. Dans nos tubes d'expérience, nous versions toujours une colonne de paraffine de 3 ½ centimètres de hauteur à peu près. Puis nous bouchions les tubes avec du coton et nous

les stérilisions. Après la stérilisation, nous choisissions seulement les tubes dont les bouchons n'étaient pas mouillés par la paraffine et, tandis que cette dernière était encore chaude, nous tournions les tubes l'un après l'autre de façon que la paraffine couvrît les parois. Il faut prendre garde qu'elle ne touche pas les bouchons. La paraffine étant encore très chaude au commencement, cette première couche n'est pas suffisamment épaisse et ne présente pas la solidité nécessaire pour pouvoir résister à la poussée verticale de bas en haut qui la force à gagner la surface de la solution : la force adhésive de la paraffine contre les parois, si elle est en couche mince, reste plus petite que la poussée verticale. Pour que cela n'arrive pas il faut ajouter à la première une nouvelle couche qui sera d'autant plus difficilement rompue qu'elle sera plus épaisse. Il nous était très facile d'obtenir cette condition, parce que la paraffine, ne se refroidissant pas facilement, il en restait au fond des tubes une goutte suffisamment grosse pour pouvoir être répartie en une deuxième et une troisième couches. Comme il arrivait toujours que la paraffine n'était pas uniformément distribuée sur les parois des tubes, nous y arrivions en les plongeant rapidement dans un vase d'eau bouillante et en les tenant verticalement. Ici encore il faut prendre des précautions. D'abord le vase qui contient l'eau bouillante doit être suffisamment profond pour que tout le tube puisse y entrer en position verticale. Deuxièmement l'opération doit se faire brusquement pour que la refonte de la paraffine commence

partout au même moment. On doit retirer le tube dès qu'on remarque le commencement de la fusion et le tenir dans l'air dans une position verticale jusqu'à ce que la paraffine soit refroidie. Dans tous les cas l'épaisseur de la couche de paraffine ne doit pas être trop épaisse, elle doit être encore assez transparente pour permettre d'observer la marche des cultures. Les tubes ainsi préparés en quantité assez grande (chaque fois nous en préparions une centaine), nous passions à la deuxième opération.

Absolument de la même façon, nous préparions un ballon d'un litre qui nous servait pour la préparation de la solution. Nous préparions toujours non pas un litre de solution, mais seulement un demi-litre. Avant de paraffiner, il faut indiquer sur le ballon une capacité d'un demi-litre, parce que, après le paraffinage, cela serait impossible. Pour cela nous versions dans le ballon un demi-litre d'eau distillée et nous marquions à l'encre tout autour du ballon les limites de l'eau. Ce repère doit être tracé tout autour du ballon, pour que l'on obtienne ensuite exactement la même quantité de solution, car une seule marque sur un point pourrait tromper facilement l'observateur si le ballon venait à s'incliner. Cette même exactitude peut être réalisée aussi sans que le repère soit tracé tout autour du ballon si celui-ci est toujours placé dans une position exactement horizontale, mais cela n'est pas commode. Une fois le repère obtenu, il faut passer au paraffinage, dont il n'est pas besoin de parler spécialement ici, puisqu'il se fait de la même façon que pour les tubes.

Cela étant fait, nous passions à la troisième opération, c'est-à-dire à la préparation de l'eau distillée qui devra servir à préparer les solutions. Pour cela, puisque l'eau ne doit nulle part être en contact avec du verre, il fallait utiliser un appareil dont aucune des parties constituantes ne soit en verre. Nous nous sommes servi d'un appareil dont le réservoir contenant l'eau à évaporer était en cuivre. Ce réservoir, en forme de ballon arrondi, était bouché avec un bouchon de caoutchouc, percé d'un trou suffisamment large. Les vapeurs d'eau étaient conduites par un tuyau en étain qui s'élevait verticalement jusqu'à une hauteur assez grande, puis prenait une direction horizontale et enfin descendait de nouveau verticalement. Cette dernière branche passait par un réfrigérant. Cet appareil est celui proposé par Kjehldahl et utilisé depuis plusieurs années dans l'Institut de botanique de l'Université. L'eau que nous mettions dans le réservoir de notre appareil avait été, pour plus de sûreté, déjà distillée une fois dans un autre appareil en verre. Avant d'introduire le ballon paraffiné sous l'extrémité du tuyau, et lorsque l'eau froide ne coulait pas encore dans le réfrigérant, nous laissions les vapeurs sortir librement dans l'air pendant un certain temps pour purifier définitivement le tuyau. Cela fait, nous laissions l'eau froide couler dans le réfrigérant et nous éteignions le feu, pour prendre certaines précautions nécessaires : pour éviter la fusion de la paraffine et la contamination du milieu, il faut qu'il ne sorte du réfrigérant ni vapeur ni eau. Deuxièmement, pour faire entrer l'extrémité du tuyau dans le goulot

du ballon, il est indispensable de boucher très doucement ce dernier, et, après avoir introduit le tube, il faut couvrir immédiatement avec du coton préalablement stérilisé. Et troisièmement, lorsque tout est prêt à fonctionner, il faut chauffer lentement pour que l'eau ne monte pas dans le tuyau par suite d'une forte ébullition et que le débit des vapeurs ne soit pas trop grand, ce qui amènerait un refroidissement incomplet dans le réfrigérant; dans les deux cas la paraffine serait fondue, ce qu'il faut éviter. Les deux premières précautions ont leur importance: au lieu de favoriser l'entrée d'un grand nombre de microbes dans le ballon, on en introduit très peu en travaillant soigneusement. Pour la même raison il est nécessaire qu'il n'y ait aucun mouvement dans l'air ambiant.

Après avoir obtenu un demi-litre d'eau distillée qui est en même temps stérilisée, nous introduisions les sels que nous avions préalablement stérilisés à sec, mais à une température convenable pour qu'aucune décomposition n'ait lieu.

Tout ayant été ainsi préparé, nous passions au remplissage des tubes paraffinés, qui, comme nous l'avons déjà dit, doivent être en grande quantité. Il est évident qu'il est absolument impossible de supprimer totalement l'entrée des microbes, soit dans les tubes, soit dans le ballon; mais si l'on prépare une quantité considérable de tubes, comme nous l'avons fait nous-même, et si on répète l'expérience plusieurs fois, comme c'était le cas pour nos recherches, on arrive en fin de compte à obtenir un certain nombre de tu-

bes absolument dépourvus de microbes. Pour plus de sûreté et surtout pendant les jours d'été, lorsque l'évaporation se fait facilement, ce qui altérerait la proportion centésimale de la solution, nous avons bouché nos tubes avec de petits capuchons de papier non verni.

b) *La solution renferme le potassium et le calcium.*

Pour cette expérience, nous n'avons pas fait des solutions à différentes concentrations, car nous avons admis que si elle réussit pour une seule, elle réussira pour toutes les autres. Nous n'avions qu'à choisir la concentration où l'algue se développait très bien dans les expériences précédentes. C'est la solution à 5 ‰ de sels que nous avons choisie.

L'expérience suivante a été mise en marche le 6 mai 1902.

4 éprouvettes à parois paraffinées renfermant la solution complète.

c) *La solution ne renferme pas de potassium.*

La même solution à 5 ‰, mais cette fois sans potassium, a été utilisée pour la réalisation d'une seconde série d'expériences. Nous avons établi cette série à la même date que la précédente et dans les mêmes conditions de lumière et de chaleur :

4 éprouvettes à parois paraffinées renfermaient la solution sans potassium.

d) *La solution ne renferme pas de calcium.*

Parallèlement avec les deux premières séries d'expériences, nous en avons établi une troisième. La même concentration a été employée, mais en l'absence de calcium. Les éprouvettes étaient placées dans les mêmes conditions physiques :

4 éprouvettes à parois paraffinées renfermaient la solution sans calcium.

Ces trois séries étant mises en marche à la même date et placées dans les mêmes conditions physiques, leurs résultats devaient être absolument comparables.

Les résultats obtenus par ces séries d'expériences prouvent que la méthode est de toute importance. En effet, ils ne concordent plus avec ceux obtenus dans des tubes non paraffinés. Il va sans dire que pour la solution de Detmer complète, il n'y a aucun changement, mais pour les deux dernières séries tout a changé complètement. Ainsi pour la solution sans calcium, *il y a encore un petit développement, suffisant* pour ne pas être négligé, mais la date de commencement est plus tardive et les colonies cessent de s'accroître à partir d'un certain moment. Dans la solution sans potassium *Stichococcus* ne se développe plus.

La prépondérance du potassium est donc évidente. Il en résulte que les deux éléments sont nécessaires ; l'expérience fut répétée plusieurs fois et nous avons toujours obtenu absolument les mêmes résultats.

En opérant avec *Chlorella vulgaris*, nous avons constaté les mêmes faits. Comme *Stichococcus*, cette algue se développe dans les deux solutions, mais toujours plus intensivement. Dans la solution sans potassium, comme ailleurs dans toutes les expériences, *Chlorella* présente des particularités intéressantes. Ainsi, au lieu d'arrêter son développement dès le commencement, comme l'a fait *Stichococcus*, elle le prolonge un peu pour l'arrêter définitivement au bout de quelques jours.

§ 3. Cultures dans une solution de sels ammoniacaux.

Nous avons déjà dit dans notre introduction qu'on n'a jamais essayé de supprimer les sels minéraux qu'on trouve dans les cendres des plantes pour les remplacer par des sels ammoniacaux dans les recherches expérimentales. Il est vrai qu'on n'a pas nié que les sels ammoniacaux pussent remplacer les minéraux, mais il est également vrai qu'on n'a jamais essayé de vérifier cette idée. Que le résultat soit positif ou négatif, peu importe, pour la science les deux cas ont la même importance.

Nous avons entrepris ce genre de recherches, le 9 mai 1902.

La solution qui servait comme milieu nutritif pour l'algue était la suivante :

Formule du milieu.

Nitrate d'ammonium	1 gramme.
Phosphate »	1 »
Sulfate »	1 »
Chlorure ferrique .	traces.
Eau distillée . . .	1 litre.

Toute la technique pour ces recherches est absolument la même que pour les expériences précédentes : c'est la *méthode de paraffinage* qui était appliquée.

Les sels que nous avons employés pour la solution devaient être d'une pureté absolue. Nous les avons vérifiés sur la plaque de platine : après les avoir chauffés, il n'en restait aucune trace, même en regardant à la loupe : tout s'évaporait. M. le professeur Chodat les a vérifiés lui-même et il a obtenu le même résultat. Ainsi, nous étions sûrs de nos sels et nous pouvions expérimenter sans aucune hésitation.

Nous expérimentions toujours avec *Stichococcus*, mais cette fois-ci, parallèlement avec lui, nous avons mis en culture, non pas seulement *Chlorella vulgaris*, mais aussi *Dyctiosphærium*. Notre expérience ainsi était faite sur davantage de types, et il était possible qu'un, au moins, parmi ces trois organismes différents, pût se développer dans ces nouvelles conditions.

Notre expérience fut répétée huit fois, sept fois par nous-même et une fois par M. Chodat.

Voici la série d'éprouvettes pour les trois plantes :

10 éprouvettes à parois paraffinées renfermant la solution nutritive pour *Stichococcus* :

10 éprouvettes à parois paraffinées renfermant la solution nutritive pour *Chlorella vulgaris*;

10 éprouvettes à parois paraffinées renfermant la solution nutritive pour *Dictyosphærium*.

La répétition de l'expérience est d'une grande nécessité pour ne pas arriver à des conclusions, il est vrai séduisantes, mais qui n'ont rien à faire avec la réalité. Ainsi, au commencement, lorsque notre expérience n'avait été répétée que trois fois, nous avons obtenu pour *Stichococcus* et pour *Dictyosphærium* un assez bon développement, mais qui, au bout de quelque temps, s'arrêtait définitivement; pour *Chlorella*, il semblait qu'elle ne fût pas troublée par ce milieu. Mais en répétant les expériences avec soin, nous avons pu constater ensuite que ces conditions étaient préjudiciables à la vie de ces organismes inférieurs. Nous sommes arrivé en fin de compte à prouver que l'expérience est *négative*. *Chlorella* se développe encore un peu, mais s'arrête bientôt. Peut-être le potassium qui se trouve dans la cellule lui aide-t-il à lutter pendant quelque temps, après quoi elle succombe. Cela prouve simplement le caractère indifférent de ce petit organisme.

Il va sans dire que la question n'est pas définitivement tranchée. Il serait très intéressant d'essayer avec beaucoup d'autres plantes et surtout en employant d'autres substances que celles que nous avons employées, mais qui toutefois ne renfermeraient ni potassium, ni calcium.

Conclusions.

De nos recherches sur *Stichococcus* et *Chlorella*, au point de vue de l'importance du potassium et du calcium, il se dégage un certain nombre de conclusions dont les principales sont les suivantes :

Stichococcus.

1. Pour le développement normal de cette algue, les sels minéraux de potassium et de calcium, qui font partie intégrante des cendres des plantes supérieures sont nécessaires, mais cette nécessité n'est pas de même ordre pour les deux éléments : le potassium étant plus important que le calcium ;

2. Le développement commence d'abord dans les solutions moins concentrées, que la solution soit normale ou dépourvue de calcium, et il se fait ultérieurement avec régularité : le développement diminue d'intensité avec l'augmentation de la concentration ;

3. Avec l'élimination du potassium, toute régularité dans le développement cesse ; il n'y a ni augmentation ni diminution de l'intensité et, en outre, la plante se développe beaucoup moins intensivement que dans la solution normale ;

4. Avec l'élimination du calcium, le développement se fait d'après la même loi de régularité que dans la solution normale, mais avec une intensité moindre ;

5. La limite supérieure de développement est 6 % dans la solution normale et dans celle sans calcium; pour la solution sans potassium, il n'y a ni maximum, ni optimum, ni minimum; l'algue étant partout développée dans cette solution, cela prouve que l'excès de potassium agit comme un poison;

6. Le minimum et l'optimum, dans les conditions de nos expériences, restent inconnus.

Chlorella.

7. Les sels minéraux de potassium et de calcium sont pour cette plante de la même nécessité que pour *Stichococcus*;

8. L'optimum, dans la solution normale est connu, c'est 5 ‰; le maximum est également connu, c'est 6 %, comme pour *Stichococcus*; il n'y a que le minimum qui reste inconnu. Dans la solution sans potassium s'observe la même anomalie que pour *Stichococcus*: il n'y a ni maximum, ni optimum, ni minimum, partout le développement présente la même intensité.

Dans la solution sans calcium, le maximum n'est pas connu; — le calcium faisant défaut, la plante se trouve libérée de tout obstacle. Il paraît par conséquent que, pour *Chlorella*, contrairement à ce qui a lieu pour *Stichococcus*, ce n'est pas l'excès de potassium qui agirait comme poison, mais bien le calcium;

9. De la comparaison des résultats pour *Stichococcus* et pour *Chlorella*, il découle que pour la solution normale, ils reposent sur la même loi: il y a simplement

une différence quantitative et non pas qualitative. Dans la solution sans potassium, le changement de développement se fait également suivant une même loi : à savoir anomalie identique pour toutes les concentrations et pour les deux plantes. Dans la solution sans calcium, *Stichococcus* reprend sa régularité comme dans la solution normale et, à cause de l'excès de potassium, il s'arrête à 6 %; *Chlorella* reprend aussi sa régularité, mais en sens contraire que pour la solution normale : plus la concentration est forte, mieux elle se développe;

10. Pour *Stichococcus* et pour *Chlorella*, le potassium est plus important, puisque son absence provoque un développement anormal pour les deux plantes Cette conclusion se confirme davantage par les résultats obtenus dans la solution sans calcium : ici le potassium, agissant seul, pousse *Chlorella* très loin dans son développement; pour *Stichococcus*, s'il n'active pas son développement, il le fait du moins reprendre sa marche normale.

11. Donnons à toutes ces conclusions une forme plus abstraite. Dans la solution normale, les mêmes conditions agissant pour les deux plantes, des résultats identiques ont été obtenus. Dans la solution sans potassium, les conditions sont également les mêmes pour les deux plantes et produisent les mêmes résultats, mais différents des premiers; la cause de la différence doit être cherchée dans l'absence du potassium, parce qu'il n'y a que lui qui varie. Dans la solution sans calcium, les mêmes conditions agissant pour les deux plantes, les résultats sont différents. La raison ne peut en être

cherchée uniquement dans l'absence du calcium, mais bien *aussi dans la présence du potassium;*

12. En nous servant de tubes à parois paraffinées, nous avons constaté que les deux plantes, cultivées dans la solution sans calcium, se développent encore pendant un certain temps, qui est différent pour les deux plantes, mais ne tardent pas à arrêter leur développement. Dans la solution sans potassium, *Stichococcus* ne se développe pas, tandis que *Chlorella* lutte encore quelques jours pour s'arrêter définitivement. Ici encore la prépondérance du potassium est démontrée;

13. Dans les expériences où les deux éléments étaient éliminés, c'est-à-dire là où nous avons remplacé les sels minéraux par des sels ammoniacaux, le résultat est négatif: *Chlorella* seulement, à cause peut-être du potassium qu'elle renferme, peut lutter pendant quelque temps.

CHAPITRE II

Relations entre le saprophytisme et la nutrition de Stichococcus.

Sommaire. — Section première. Cultures dans la lumière. — § 1. Cultures sur gélose : *a)* Gélose dissoute dans la solution de Detmer : *b)* Gélose nutritive et additionnée de glucose : *c)* Gélose nutritive peptonisée ; *d)* Gélose nutritive glucosée et peptonisée ; *e)* Gélose nutritive dont l'azote n'est donné que sous forme de peptone. — § 2. Cultures sur gélatine : *a)* Gélatine seule dissoute dans de l'eau distillée ; *b)* Gélatine dissoute dans la solution de Detmer : *c)* Gélatine nutritive glucosée : *d)* Gélatine nutritive peptonisée ; *e)* Gélatine nutritive glucosée et peptonisée ; *f)* Gélatine nutritive dont l'azote minéral est remplacé par l'azote de la peptone.

Section II. — Culture dans l'obscurité. — § 1. Cultures sur gélose : *a)* Gélose dissoute dans la solution de Detmer ; *b)* Gélose nutritive glucosée. § 2. Cultures sur gélatine : *a)* Gélatine dissoute dans la solution de Detmer ; *b)* Gélatine nutritive glucosée.

Introduction

Dans les expériences que nous exposerons dans ce chapitre nous aurons à nous occuper de la recherche

des causes de la chlorose et du saprophytisme des algues.

L'on sait que la chlorose est plus particulièrement connue pour les feuilles de vigne, où elle résulte de plusieurs causes différentes. Elle consiste dans la diminution de l'intensité de la teinte verte et dans le jaunissement définitif. Elle peut causer parfois la mort de toute la plante, On reconnaît que ces effets sont dûs à l'action de divers parasites ou de différents facteurs non encore complètement élucidés.

La chlorose qui va nous occuper n'est pas due à l'action d'organismes parasites, parce que les cultures que nous avons mises à l'étude sont, comme nous avons déjà eu l'occasion de le dire dans notre introduction générale, d'une pureté absolue. La cause, ou plutôt les causes, car il est très probable que ce phénomène soit provoqué par le concours de causes multiples, doivent être cherchées ailleurs. Ce ne serait pas même une maladie, mais bien une adaptation due au changement dans le mode de vie de l'organisme. Cette question est fort obscure et on peut dire qu'on ne la connait guère pour le moment. Les résultats que nous ont donnés nos expériences nous permettent de penser que ce phénomène est étroitement lié à la nature chimique du substratum et à la lumière. La diminution dans l'intensité de cette dernière ne peut être la cause principale de ce phénomène, pour les raisons suivantes : plusieurs plantes phanérogames, tout en étant vivement vertes sont parasites ou saprophytes (*Rhinanthaceæ*, etc.); un certain nombre d'algues

aussi, comme les gonidies *Stichococcus Solorina* et *Dictyosphærium* verdissent dans l'obscurité. C'est pour ces raisons d'une part et en expérimentant d'autre part avec différentes substances organiques sur *Hormococcus dissectus*, que M. Chodat[1] disait dans une communication à la « Société Botanique de Genève » : « Il devient très probable que le saprophytisme des algues, quand il est réalisé. et sans doute celui des phanérogames, comme leur parasitisme, consiste bien plus exclusivement dans une dépendance vis-à-vis de l'hôte quant à la nourriture hydrocarbonée, que dans le besoin d'absorber l'azote sous une forme organique ».

On sait en effet que toutes les substances organiques sont caractérisées par le carbone et par leur capacité de le brûler. Par suite de cette combustion il se forme de l'anhydride carbonique et d'autres composés et il se dégage de la chaleur. Le même phénomène, c'est-à-dire formation de CO_2 a lieu lorsqu'on brûle du carbone dans de l'oxygène. La réaction inverse sera caractérisée par une absorption de la chaleur. Quand on décompose par conséquent l'anhydride carbonique en carbone et en oxygène on doit employer une certaine quantité d'énergie cinétique (chaleur), qui passera à l'état potentiel dans le carbone. Cette énergie, la plante la prend du soleil à l'aide de la chlorophylle et exerce un travail mécanique pour la synthèse des hydrates de carbone. C'est donc à provoquer cette synthèse que cette énergie est destinée.

[1] Bulletin de l'Herbier Boissier, 1903.

La question maintenant est de savoir si la plante peut se passer de la lumière solaire si on la dispense de la formation des hydrates de carbone en lui procurant le carbone sous forme hydro-carbonée. C'est ce qu'on a réussi à faire pour les phanérogames [1]. En donnant à des feuilles placées à l'obscurité des hydrates de carbone, les composés azotés se forment. On provoque ainsi le parasitisme des plantes supérieures d'une façon artificielle. N'est-on pas dans le même cas lorsqu'on met des gonidies de lichens dans des conditions artificielles où le carbone est procuré sous forme de sucre, par exemple? Cette hypothèse semble être prouvée aussi par nos expériences qui nous amenèrent à la conclusion que les algues avec lesquelles nous avons expérimenté cherchent non pas l'azote sous une forme organique, mais bien le carbone.

Le sujet de ce chapitre est divisé en deux sections. L'une comprend la culture dans la lumière, l'autre celle dans l'obscurité. Chacune de ces sections comprend deux paragraphes. L'un pour les cultures établies sur des milieux gélosés, l'autre pour celles sur des milieux gélatinisés.

Comme hydrate de carbone nous avons utilisé la glucose. Pour savoir sous quelle forme l'algue préfère l'azote, nous avons remplacé dans certaines de nos cultures l'azote minéral par l'azote organique (peptone).

[1] Zalesky. Berichte Botan. Gesellschaft. 1897. Cité par M. Palladine dans la quatrième édition russe de sa physiologie.

*
* *

Nous n'aurons pas à nous occuper de toute la bibliographie de cette question, M. Grintzesco l'a fait déjà dans sa thèse sur la physiologie et la morphologie de *Scenedesmus acutus* Meyen [1]. Nous nous contenterons d'indiquer seulement les travaux les plus importants et surtout ceux qui ont paru ultérieurement. Ce travail sera accompli à mesure que le besoin s'en fera sentir.

Disons ici quelques mots seulement sur les cultures pures. Beyerinck [2] est le premier qui ait isolé les algues par la méthode bactériologique. Mais il n'expérimentait pas avec des espèces pures, car, dans ses anciennes cultures du moins, il admettait dans le même milieu la présence de microbes. Les bactéries ayant souvent un pouvoir liquéfiant, peuvent troubler facilement le milieu, surtout lorsqu'on cultive sur la gélatine, comme le faisait Beyerinck lui-même.

Chodat [3] et Grintzesco, n'admettent pas que les cultures de Beyerinck puissent être mises en comparaison avec des cultures strictement pures. Ces auteurs appellent « cultures pures » celles qui ne comprennent qu'une seule espèce et qui sont débarrassées de microbes.

[1] Grintzesco, Jean. *Recherches expérimentales sur la Morphologie et la physiologie de Scenedesmus acutus Meyen*. Bulletin de l'Herbier Boissier, 1902.

[2] Beyerinck, M.-W. *Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichengonidien und anderen niederen Algen*, Bot. Zeit., n° 45, 1890.

[3] Chodat R. et Grintzesco, J. *Sur les méthodes des cultures pures des algues vertes*. Compte rendu du congrès de botanique de Paris, 1900.

Hansen[1] va plus loin et dit qu'une espèce ne peut être regardée comme pure que si elle procède d'une seule cellule. Il se base sur le fait que beaucoup de microorganismes se ressemblent tellement qu'il est impossible de les distinguer les uns des autres.

SECTION PREMIÈRE

Cultures dans la lumière.

§ 1. Cultures sur gélose.

a) *Gélose dissoute dans la solution de Detmer.*

Formule du milieu.

Azotate de calcium	1 gr.
Chlorure de potassium	0,25 »
Sulfate de magnésium	0,25 »
Phosphate acide de potassium. . .	0,25 »
Chlorure ferrique	traces
Eau distillée	un litre
Agar-agar	1,5 %

Avant de dissoudre l'agar dans cette solution il est nécessaire de le laver soigneusement dans une solu-

[1] Voir Palladine. *Physiologie des plantes.* Quatrième édition russe. St-Pétersbourg. 1903.

tion de $^1/_{200}$ d'acide chlorhydrique. Nous laissions l'agar séjourner dans la solution acide pendant 24 heures après quoi nous passions aux lavages par l'eau distillée. Mais pour que toute trace d'acide disparaisse nous versions quelques gouttes d'ammoniaque. L'agar était laissé dans ces conditions pendant quelques heures et nous lavions de nouveau. Ainsi nous étions sûr d'avoir débarrassé l'agar de substances minérales et d'acide chlorhydrique.

La gélose ainsi préparée, et rendue nutritive par la solution de Detmer, constitue pour les cultures d'algues un milieu qui est toujours à recommander.

L'expérience suivante fut mise en marche le 23 janvier 1902 :

6 flacons d'Erlenmeyer renfermant la gélose nutritive.

L'ensemencement est fait par des piqûres.

Dans ces conditions, le développement commence très rapidement. Nous avons fait la première observation le 26 janvier, c'est-à-dire trois jours après l'inoculation et nous avons constaté que les colonies de *Stichococcus* étaient déjà visibles à l'œil nu. La forme des colonies est sphérique et la coloration vert-pâle. Leur accroissement, à partir de ce moment, se fait très activement, étant donné que la température du laboratoire était maintenue entre 10° et 14° centigrades. En été, lorsque la température s'élève considérablement, le résultat n'est plus le même : l'activité est considérablement affaiblie. Sans nous occuper spécialement de la question de température, disons cependant à ce sujet

quelques mots qui nous semblent indispensables pour ce cas particulier. En cultivant *Stichococcus* au thermostat et en répétant l'expérience trois fois, nous avons constaté que le maximum de température où cette algue peut se développer doit être cherché entre 22° et 29°. A 29°, C., l'algue meurt, les semences que nous avons introduites deviennent brunes et en les transportant à la température du laboratoire, elles ne recommencent pas leur développement, ce qui prouve qu'elles sont mortes. A 22°, *Stichococcus* ne meurt pas, mais les colonies sont toutes petites. Nous n'avons pas établi des cultures de *Stichococcus* à des températures plus basses que celles du laboratoire et par conséquent nous ne sommes pas en droit de dire si l'optimum de la température correspond justement à 10-14° ou s'il se trouve plus haut ou plus bas. Mais nous pouvons conclure de ces observations qu'il est préférable d'expérimenter avec *Stichococcus* pendant l'hiver.

Lorsque, le 11 février, nous avons pris de nouvelles notes, nous avons constaté un changement dans la forme des colonies. Après avoir été sphériques, puis de forme lenticulaire, elles avaient pris une forme bizarre, lobée; les lobes émis dans toutes les directions se prolongent à de faibles distances. En outre, leur coloration de vert-pâle est devenue vert-foncé. Le développement a lieu aussi dans l'intérieur du milieu, mais il est très faible et la couleur est moins intense.

L'expérience était terminée le 23 mai 1902.

b) *Gélose nutritive et additionnée de glucose.*

Pour cette expérience, nous avons pris la même gélose nutritive que pour l'expérience précédente, mais additionnée de 2 % de glucose.

L'expérience était mise en marche à la même date et dans les mêmes conditions.

Première série : 6 flacons d'Erlenmeyer contiennent l'agar nutritif glucosé.

Deuxième série : 6 autres flacons renferment l'agar nutritif sans glucose. Ils nous serviront pour comparer les résultats.

L'ensemencement a été fait par piqûres.

Les deux séries ont été placées dans les mêmes conditions physiques. La température du laboratoire se maintenait toujours entre 10° et 14° C.

Le développement est très rapide et après trois jours, les colonies, visibles déjà à l'œil nu, montrent la même grandeur dans les deux milieux et sont d'une couleur vert-pâle. Mais ceci a lieu au commencement de l'expérience; plus tard il y a un changement. Dans le milieu glucosé, les cultures sont favorisées. La forme des colonies est également sphérique au début, comme pour le milieu non glucosé, mais tandis que, dans ce dernier milieu, les colonies ont passé plus tard par la forme lenticulaire et par la forme lobée dont nous avons parlé, les colonies dans le milieu glucosé étaient à ce moment-là encore de forme lenticulaire, quoiqu'elles aient dépassé de beaucoup les premières en grandeur. Le 11 février, nous avons mesuré le diamètre des unes et

des autres et nous avons trouvé une différence frappante. Ainsi pour les colonies de la série glucosée, il présentait une grandeur de 5 mm., tandis que, pour celles de la série non-glucosée, il ne mesurait que 2 mm. Ces chiffres nous montrent clairement le pouvoir accélérateur du glucose sur le développement de *Stichococcus*. Plus tard, la forme des colonies dans le milieu glucosé a changé.

Elles émettent des prolongements en toutes directions et ces prolongements, en se rencontrant les uns avec les autres, forment un réseau de mâcles. Nous avons observé attentivement ce phénomène et nous avons constaté qu'il est en relation avec l'humidité du milieu. Il n'a lieu que dans les flacons dont la surface est humide. En outre, l'eau étant accumulée principalement au bord du milieu par attraction capillaire du verre, c'est là que le développement atteint son maximum. Il semble par conséquent que les milieux liquides conviennent beaucoup mieux pour le développement de *Stichococcus*. Peut-être, ce phénomène est-il encore en rapport avec la concentration du milieu. A proprement parler, dans de pareilles conditions, on a non pas un seul milieu, mais bien deux : l'un solide et l'autre liquide. Le liquide est sans doute moins concentré en substances minérales que le solide. Ce fait est absolument d'accord avec le résultat que nous avons trouvé pour *Stichococcus*, lorsque nous expérimentions dans la solution de Detmer, préparée en différentes concentrations : plus la concentration du milieu diminue, plus le développement augmente.

L'expérience était achevée le 23 mai 1902. Jusqu'à ce moment, l'accroissement des colonies allait toujours avec la même rapidité et leur couleur restait verte. *Le glucose en excès n'a donc pas une action décolorante sur Stichococcus lorsqu'il est cultivé dans la lumière et sur des milieux solides agarisés, mais il active les cultures sans avoir une action mortelle sur l'algue.*

c) *Gélose nutritive peptonisée.*

Grintzesco[1], en cultivant *Scenedesmus acutus* sur agar nutritif peptonisé (0,50 % de peptone), constate que cette algue se développe et que même, le développement dans ces conditions ne présente aucune différence avec celui dans la gélose nutritive sans peptone.

Chodat[2], trouve que *Hormococcus dissectus* donne un beau développement dans la lumière sur la gélose peptonisée. L'auteur en tire la conclusion que l'algue, pouvant assimiler CO_2 de l'atmosphère, la peptone lui sert comme source d'azote, étant donné que l'azote du milieu ne se trouve que sous cette forme.

Voyons si *Stichococcus* peut être classé parmi les algues qui peuvent utiliser la peptone.

L'agar nutritif pour cette expérience est additionné de 1 % de peptone.

[1] Recherches expérimentales sur la Morphologie et la Physiologie de Scenedesmus acutus Meyen. Bulletin de l'Herbier Boissier, 1902.

[2] Des conditions déterminant le saprophytisme chez les Algues. Bulletin de l'Herbier Boissier, 1903.

Nous avons commencé l'expérience le 27 avril avec deux séries de milieux.

Première série : 5 flacons d'Erlenmeyer renfermant l'agar nutritif peptonisé.

Deuxième série : 5 flacons témoins, renfermant l'agar nutritif, sans glucose ni peptone.

Il n'y a point de développement dans la première série.

Nous avons répété l'expérience en diminuant la quantité de peptone à 0,5 %. Cette fois, il y avait formation de toutes petites colonies qui, au bout de quelques jours, arrêtaient définitivement leur croissance.

De ces résultats, nous sommes en droit de tirer la conclusion que la peptone, dans ces conditions, est *non pas seulement inassimilable par Stichococcus, mais qu'elle constitue un véritable poison pour son développement.* Cette conclusion sera appuyée plus fortement encore par les cultures sur gélatine peptonisée.

d) *Gélose nutritive glucosée et peptonisée.*

Il y avait 2 % de glucose et 1 % de peptone. L'expérience fut répétée aussi avec 0,5 % de peptone.

Stichococcus, dans ces conditions, ne nous a pas montré le moindre développement. Il y a toutes les conditions pour un développement vigoureux de cette algue — la solution de Detmer et le glucose, qui, comme nous l'avons vu, active fortement les cultures de *Stichococcus* — mais la peptone étant présente, l'algue est empoisonnée.

e) *Gélose nutritive dont l'azote n'est donné que sous forme de peptone.*

Nous avons voulu savoir si l'algue, faute d'autre source d'azote, se contenterait de celui de la peptone. Un résultat négatif a répondu à notre hypothèse. Nous avions pris du Detmer sans nitrate et additionné de 1 % ou 0,5 % de peptone.

Conclusions.

De toutes ces expériences, nous pouvons tirer quelques conclusions : 1. *Stichococcus* ne supporte pas les grandes chaleurs et se développe très bien sur l'agar nutritif; 2. Ce même milieu, additionné de glucose, offre de meilleures conditions à l'algue qui prend donc aussi le carbone sous forme organique ; 3. L'addition de glucose ne décolore pas l'algue ; 4. Dans toutes ces expériences, que la solution de Detmer soit complète ou dépourvue de son azote et que le milieu renferme ou non le glucose, la peptone est, pour *Stichococcus* et *dans les conditions de nos expériences*, un véritable poison et ne lui permet point de se développer.

Voyons maintenant quels seront les résultats sur les milieux gélatinisés.

§ 2. Cultures sur Gélatine.

La gélatine constitue un très bon milieu pour les cultures de *Stichococcus*, mais moins bon que l'agar. Beyerinck est le premier qui ait introduit la gélatine dans les cultures des algues. Il signale la liquéfaction de cette substance par *Scenedesmus acutus*, mais, étant donné que ses cultures renfermaient des microbes, le fait perd de sa signification. Grintzesco a constaté de nouveau ce fait, mais en opérant avec des cultures absolument pures. Tandis que Beyerinck constate que la gélatine non additionnée de substances nutritives est plus fortement liquéfiée, Grintzesco prétend le contraire.

Comment se comporterait *Stichococcus* vis-à-vis des milieux gélatinisés ? A cette question répondent les expériences qui vont suivre.

a) *Gélatine seule dissoute dans de l'eau distillée.*

Le milieu était formé de 15 gr. de gélatine + 100 gr. d'eau.

Il est nécessaire de purifier le milieu à l'aide d'un blanc d'œuf et de le filtrer ensuite. Ainsi préparé, le milieu est distribué dans des tubes à essais. Nous avons commencé, le 23 janvier 1902, la série suivante :

12 tubes renfermant la gélatine non additionnée de substances minérales.

L'ensemencement est fait par piqûres.

Résultats : Au bout de quelques jours les colonies deviennent visibles. La gélatine est fortement liquéfiée. Les colonies s'enfoncent si profondément dans le milieu qu'elles atteignent même le fond des tubes. Cette action de l'algue sur la gélatine continue sans arrêt, mais les colonies s'accroissent très lentement. La gélatine peut donc constituer un milieu complet pour le développement de *Stichococcus*, mais cette algue n'est pas ainsi dans ses conditions normales, étant donnée la lenteur avec laquelle elle se développe. La teinte verte n'est pas modifiée par ce saprophytisme.

b) *Gélatine dissoute dans la solution de Detmer.*

Dans la même solution de Detmer que nous avons toujours utilisée ont été dissous 150 grammes de gélatine par litre (15 %). En hiver, lorsque la température n'est pas élevée, 120 gr. et même 100 gr. sont absolument suffisants et *Stichococcus* préfère même un tel milieu, parce qu'il n'est pas trop sec; mais, en été, si la quantité de gélatine est moindre que 150 grammes pour un litre de solution, le milieu fond, les colonies se disséminent dans tout le milieu; la marche ultérieure des cultures devient impossible à suivre et tous les résultats sont perdus. Cela nous est arrivé plusieurs fois pendant les grandes chaleurs d'été.

On filtre et on purifie ce milieu de la même façon que dans le cas précédent et on le distribue dans les tubes.

Après stérilisation, l'expérience suivante a été mise en marche le 23 janvier 1902.

Première série : 12 tubes renferment la gélatine nutritive.

Deuxième série : 12 tubes témoins renferment la gélatine seule, dissoute dans de l'eau distillée.

Les ensemencements dans les deux séries de milieux ont été pratiqués par piqûres.

Après ensemencement, les deux séries de cultures ont été mises dans des conditions physiques identiques. Pendant toute la durée des expériences elles étaient maintenues à la même température et éclairées absolument de la même façon. Toutes les conditions physiques et chimiques de ces deux séries de culture de *Stichococcus* étant communes et ne différant que par une seule, la solution minérale de Detmer, nous avons obtenu des phénomènes différents. Voici les résultats que cette expérience nous a donné.

Résultats : Après le cinquième jour déjà les colonies deviennent visibles à l'œil nu, mais la différence de leur grandeur dans les deux milieux apparaît dès maintenant : elles sont plus volumineuses dans la gélatine nutritive. La liquéfaction a lieu dans les deux milieux, mais avec une forte différence : dans la deuxième série elle est incomparablement plus forte, contrairement à ce que Grintzesco constate pour *Scenedesmus acutus*. D'abord c'est une petite dépression que *Stichococcus* fait sur la surface du milieu; cette dépression en forme de ménisque concave absolument régulier, grandit et se transforme de plus en plus en un cône renversé, dont le sommet, c'est-à-dire le fond, est occupé par l'algue. Ce même phénomène a lieu dans les deux mi-

lieux, mais, tandis que dans la gélatine nutritive le cône a une forme régulière, dans la gélatine dépourvue de substances minérales, il prend une forme plus ou moins bizarre. *Stichococcus* s'enfonce avec une telle avidité dans la profondeur du milieu, qu'il finit par atteindre le fond des tubes. Ce résultat est beaucoup plus vite réalisé dans la seconde série. Quant à la teinte des colonies, elle reste la même ou presque la même dans les deux cas : elle est verte.

Cette expérience a été répétée trois fois et elle nous a donné toujours les mêmes résultats.

c) *Gélatine nutritive glucosée.*

Nous avons déjà vu que le glucose active le développement de *Stichococcus.* Au milieu précédent nous avons ajouté 2 % de glucose pour le rendre plus nutritif.

L'expérience a été entreprise à la même date que les deux précédentes.

Pour comparer les résultats, nous avons expérimenté aussi avec les deux premiers milieux. Trois séries de milieux gélatinisés ont donc été établies.

Première série : 12 tubes à réaction contiennent la gélatine nutritive glucosée :

Deuxième série : 12 tubes à réaction contiennent la gélatine nutritive.

Troisième série : 12 tubes à réaction contiennent la gélatine seule dissoute dans de l'eau distillée.

Les semences sont introduites par piqûres.

Ces trois séries de cultures étant placées dans des conditions différentes, nous ont donné des résultats également différents. Nous connaissons déjà la différence pour les deux dernières séries, voyons maintenant ce qui se passe pour la troisième.

Résultats : Comparées entre elles, les colonies des trois séries, cinq jours après le moment de l'inoculation, montrent une différence remarquable de la première série sur les deux autres. Les colonies, tout en étant visibles partout, présentent une dimension beaucoup plus grande dans la série glucosée. Nous avons mesuré la dimension de leur diamètre le 11 avril et nous avons obtenu les chiffres suivants : 3 mm. pour la première série, 1 mm. pour la seconde et pour la troisième série encore moins. Il devient évident que le *glucose*, comme pour les milieux agarisés *active le développement de Stichococcus sur les milieux gélatinisés*. Cette favorisation de *Stichococcus* par le glucose se continue aussi longtemps que durent les cultures.

La liquéfaction est atténuée à tel point qu'on ne la remarque presque pas dans la série glucosée. Les colonies, au lieu de pénétrer dans l'intérieur du substratum à l'aide de l'enzyme que l'algue sécrète, restent sur sa surface, sphériques au début, lenticulaires ensuite. On ne peut pas dire que le pouvoir liquéfiant soit absolument arrêté, parce que, au bout d'un temps plus ou moins long, nous avons remarqué autour des colonies un anneau étroit de dépression, ce qui nous indique que la cellule de notre algue liquéfie encore, mais très lentement.

La teinte des colonies a changé un peu sur le milieu glucosé, mais cette différence n'est pas considérable.

Il y a lieu de signaler un fait très intéressant. C'est dans la série glucosée que le phénomène se passe. En été, pendant les grandes chaleurs, et lorsque la gélatine n'est pas en quantité suffisante pour maintenir le milieu en état solide, ce dernier fond et, comme nous l'avons fait déjà remarquer, les colonies se disséminent dans la masse visqueuse. Si les colonies sont déjà suffisamment grosses, elles s'accumulent et tombent au fond du tube. Le développement est alors ralenti et l'algue brunit. Mais elle n'est pas morte, car ayant été transportée sur d'autres milieux elle reprenait son développement normal et sa couleur verte. Quelle est la substance brune qui se forme dans ces conditions anaérobies. Nous ne l'avons pas recherché pour cette algue, mais on peut supposer qu'elle doit être l'hématochrome comme pour *Protococcus* dont nous parlerons plus tard.

d) *Gélatine nutritive peptonisée.*

Artari avait reconnu pour certaines algues et gonidies de lichens cultivées sur gélatine, que la peptone est une des meilleures sources d'azote. Recherchant si la peptone peut être assimilée par *Stichococcus* sur le milieu gélatinisé, nous avons vu que, comme sur les milieux gélosés, elle constitue pour cette algue un poison.

La quantité de peptone que nous avons ajoutée à la

gélatine nutritive pour cette expérience était 1 %. Ce premier essai nous a donné des résultats négatifs.

La même expérience fut répétée avec 0,5 % de peptone. Cette fois, nous avons obtenu de très petites colonies qui, au bout d'un temps très court, arrêtaient définitivement leur développement.

Nous avons répété l'expérience encore une troisième fois, mais en mettant des quantités de peptone extrêmement petites : 1/20 % et 1/40 %. Nous avons inoculé six tubes pour chacune de ces deux séries ; six autres tubes renfermaient la gélatine nutritive sans peptone et constituaient une troisième série témoin.

Les résultats furent alors plus satisfaisants que les premiers, mais ne peuvent jamais être comparés à ceux obtenus dans les milieux non peptonisés. Ainsi, dans la première série, le développement est assez fort, et dans le deuxième plus fort encore, mais les colonies n'ont jamais pu rattraper celles des milieux non peptonisés. Il est évident que, si nous continuions à diminuer la peptone en en ajoutant des quantités de plus en plus petites jusqu'à la supprimer tout à fait, nous arriverions à obtenir le développement normal de *Stichococcus*.

Il en résulte ce que nous avons mentionné déjà à propos de la gélose nutritive peptonisée, à savoir que sur les milieux gélatinisés aussi, si l'on ajoute de la peptone, cette dernière, non seulement, ne peut être assimilée, *mais encore, dans les conditions de notre expérience, elle est un véritable poison pour le développement de Stichococcus.*

e) *Gélatine nutritive glucosée et peptonisée.*

Puisque le glucose présente un aliment très favorable pour *Stichococcus*, nous nous sommes demandé s'il peut être assimilé par cette algue dans le milieu gélatinisé en présence de la peptone. Pour le savoir nous ajoutons à la gélatine nutritive 2 % de glucose et 1 % de peptone. Deux séries ont été préparées.

Première série : 12 tubes à réaction contiennent le milieu glucosé et peptonisé;

Deuxième série : 12 tubes à réaction contiennent le milieu glucosé sans peptone.

Toutes conditions égales, d'ailleurs, il n'y a que la peptone qui distingue ces deux séries.

Le résultat est négatif. Dans la première série, quoique le pouvoir nutritif ait augmenté par suite de l'addition du glucose, nous n'avons remarqué aucun développement. La peptone, par conséquent, même en présence du glucose, empoisonne l'algue.

La même expérience fut répétée une deuxième fois, mais en ajoutant 0,5 % de peptone. Cette fois, le développement a commencé, mais pour s'arrêter définitivement au bout de quelques jours. Il n'y avait formation que de toutes petites colonies.

Cette expérience ne laisse plus aucun doute sur le fait que la peptone empoisonne *Stichococcus*, même quand elle est donnée en petite quantité: néanmoins, nous continuons nos recherches en supprimant tout à fait l'azote minéral et en ne donnant à l'algue que de l'azote sous forme de peptone.

Nous avons établi l'expérience de la façon suivante :

f) *Gélatine nutritive dont l'azote minéral est remplacé par l'azote de la peptone.*

Nous avons remplacé l'azotate de calcium par le chlorure de calcium et avons ajouté au Detmer une première fois 1 % de peptone, une seconde fois 0.5 %.

Cette expérience est plus concluante que toutes les autres, car, même lorsque la peptone est en quantité de 0,5 %, *Stichococcus*, contrairement à ce qui avait eu lieu dans les deux expériences précédentes, *ne montre pas le moindre développement*, ce qui prouve que cette algue n'utilise nullement l'azote de la peptone.

Conclusions.

De ces différentes expériences se dégagent un certain nombre de conclusions qui sont les suivantes :

1° La gélatine constitue à elle seule une nourriture pour *Stichococcus minor*; si elle est rendue nutritive par la solution de Detmer, l'algue se développe beaucoup mieux;

2° Le glucose active beaucoup le développement de *Stichococcus*;

3° L'addition du glucose n'influe pas sur la couleur des colonies, ou très peu ;

4° La liquéfaction est plus active dans les milieux moins riches en substances nutritives ;

5° Que la gélatine nutritive soit additionnée ou non

de glucose, ou que la solution soit complète ou ait son azote remplacé par celui de la peptone, cette dernière étant présente, le développement est arrêté. La peptone est donc un véritable poison pour *Stichococcus*.

* * *

Si nous comparons les conclusions que nous avons tirées des expériences sur les milieux gélosés à celles que nous venons de formuler, nous arriverons à une conclusion plus générale :

Stichococcus, cultivé dans la lumière, sur des milieux gélosés et gélatinisés, et dans les conditions de nos expériences, est favorisé par le glucose et empoisonné par la peptone et il ne peut pas assimiler le glucose si la peptone est présente dans le milieu.

SECTION II

Cultures dans l'obscurité.

Introduction.

Artari[1] a constaté pour les gonidies de *Xantoria parietina* et de *Gasparina murorum* que le verdissement de ces algues a lieu aussi à l'obscurité. Il constate, en outre, que la vigueur des cultures dans l'obscurité

[1] Untersuchungen über Entwickelung und Systematik einiger Protococcoïdeen, Bull. Soc. Impér. des Natur. de Moscou, 1892.

et dans la lumière ne présentait aucune différence. D'après cet auteur, l'obscurité est même préférable pour les organismes en question.

Radais[1] a fait l'analyse spectrale du pigment de *Chlorella vulgaris* Beyer., cultivé à l'obscurité, et a montré qu'on est en présence de la chlorophylle.

Grintzesco[2] a trouvé, pour *Scenedesmus acutus*, que l'absence de lumière retarde son développement. Les colonies obtenues dans l'obscurité sont, d'après cet auteur, 3 à 4 fois plus petites que celles dans la lumière.

Le même auteur a constaté dernièrement le contraire pour *Chlorella vulgaris* Beyerinck[3].

Matruchot et Molliard[4], étudiant la variation de la morphologie de *Stichococcus baccilaris* dans différents milieux, ont contaté également, en passant, que l'intensité de développement pour cette algue diminue quand elle est cultivée dans l'obscurité. Ces auteurs ne parlent pas de pouvoir liquéfiant à propos de ce microorganisme.

Chodat[5], qui a étudié ou a fait étudier un certain nom-

[1] Sur la culture d'une algue verte; formation de chlorophylle à l'obscurité. Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Paris, 1900.

[2] Recherches expérimentales sur la Morphologie et la physiologie expérimentale de Scenedesmus acutus Meyen. Bulletin de l'Herbier Boissier, 1902.

[3] Contribution à l'étude des Protococcoïdées : Chlorella vulgaris Beyerinck. Revue générale de Botanique. 1903.

[4] Variation de structure d'une algue verte sous l'influence du milieu nutritif. Revue générale de botanique. 1902.

[5] Voir Chodat et Adjarof, Conditions de nutrition de quelques algues en cultures pures. Archives des Sciences physiques et naturelles, mars 1903. Genève.

bre d'algues, a montré qu'aucune n'indique une préférence marquée pour l'obscurité.

Les expériences qui suivront nous montreront l'effet de l'obscurité pour *Stichococcus*.

Le nombre des expériences pour ce genre de recherches est plus restreint que pour les précédentes. La peptone, empêchant toujours *Stichococcus* de se développer dans la lumière, nous ne jugions pas nécessaire de faire de nouvelles expériences à ce sujet dans l'obscurité. Nous nous intéressions à savoir seulement *si le glucose est assimilé par Stichococcus dans l'obscurité, si le verdissement de cette algue a lieu à l'abri de la lumière et si l'absence de lumière exerce une influence sur l'intensité de son développement.*

Pour le rechercher, nous établissons des cultures sur deux sortes de milieux, l'un gélosé et l'autre glycériné. Chacun de ces milieux renferme deux catégories, l'une sans glucose et l'autre avec glucose.

Les cultures étaient toujours comparées avec d'autres exposées à la lumière.

Les expériences ont été commencées le 7 janvier 1902 et terminées le 1er juillet.

§ 1. Cultures sur gélose.

a) *Gélose dissoute dans la solution de Detmer.*

Le milieu de culture que nous avons employé pour cette expérience est toujours le même que celui utilisé

jusqu'ici, c'est-à-dire 15 grammes d'agar-agar sont dissous dans un litre de solution de Detmer. Ce milieu, après stérilisation, est distribué dans des flacons d'Erlenmeyer. L'expérience suivante a été mise en marche :

Première série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent le milieu destiné aux cultures à l'obscurité;

Deuxième série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent le milieu destiné aux cultures dans la lumière, et qui nous serviront de comparaison.

Les inoculations sont faites par piqûres et les 4 premiers flacons ainsi ensemencés sont immédiatement enfermés dans une boîte en carton noir. La boîte, en outre, est introduite dans l'obscurité absolue de la chambre noire du laboratoire. Les 4 autres flacons sont mis dans la vitrine exposée à la lumière diffuse et très bien éclairée.

Pour que les cultures de la première série deviennent observables à l'œil nu, il est nécessaire d'attendre un temps plus long que pour la deuxième série. L'obscurité montre donc dès le début son influence retardatrice sur le développement de *Stichococcus*. Ce retard se manifeste pendant toute la durée de l'expérience et lorsqu'à la fin nous avons mesuré le diamètre des colonies, nous avons trouvé que ces dernières sont 5 à 6 fois plus petites dans l'obscurité. Dans tous les cas, *Stichococcus*, même dans l'obscurité absolue, peut encore assimiler les substances minérales sans aucune addition de nourriture organique autre que la gélose. La teinte des colonies, comparée à celle constatée pour les cul-

tures dans la lumière est un peu affaiblie : elle est vert pâle dans l'obscurité. Il y a, par conséquent, une succession de cause à effet, à savoir : *la suppression de la lumière provoque une diminution dans l'intensité de la teinte chlorophyllienne, intensité suivie d'un affaiblissement dans le développement.*

b) *Gélose nutritive glucosée.*

Voyons maintenant si le glucose qui était assimilé par *Stichococcus* dans la lumière et rendait ainsi les cultures plus vigoureuses, peut l'être aussi dans l'obscurité : Pour cette recherche, le milieu de culture, de l'expérience précédente, a été additionné de 2 % de glucose, pour pouvoir comparer les cultures à la fois avec celles obtenues sur le milieu non glucosé, d'une part, d'autre part avec celles placées dans la lumière; nous avons établi trois séries, à savoir :

Première série : 4 flacons d'Erlenmeyer renferment l'agar nutritif glucosé, destiné aux cultures dans l'obscurité ;

Deuxième série : 4 flacons d'Erlenmeyer renferment l'agar sans glucose, destiné aux cultures dans l'obscurité;

Troisième série : 4 flacons d'Erlenmeyer renferment l'agar glucosé, et seront placés dans la lumière.

Ces trois séries sont placées identiquement dans les mêmes conditions de lumière, d'obscurité et de chaleur.

Voyons d'abord ce qui se passe dans l'obscurité. Là,

nous avons deux séries de cultures pures de *Stichococcus* placées dans les mêmes conditions chimiques et physiques, mais différant par une seule condition : le glucose. La différence dans l'intensité du développement est frappante. Les colonies sur le milieu non glucosé sont dix fois environ plus petites que sur le milieu glucosé. *Cette accélération du développement est provoquée par l'addition du glucose*; il est donc assimilé dans l'obscurité par *Stichococcus*. La teinte verte est affaiblie exactement de la même façon dans les deux séries. Comme nous l'avons dit déjà, elle est vert pâle. *L'addition de glucose n'a donc aucune influence sur la teinte de la chlorophylle*. Il semble, par conséquent, que la chlorose, si faible soit-elle pour *Stichococcus* dans les conditions de notre expérience, est provoquée non pas par le saprophytisme de cette algue, *mais bien par l'absence de lumière*.

Passons maintenant à la comparaison des cultures dans l'obscurité et dans la lumière sur la gélose nutritive glucosée. Disons tout de suite que nous avons constaté, comme dans l'expérience précédente, la même dépendance entre la lumière et la vigueur des cultures, c'est-à-dire que dans l'obscurité le développement est considérablement ralenti. Le même retard et la même proportionnalité dans la grandeur des colonies s'observent.

Cette expérience, comme la précédente et toutes celles qui vont suivre, ont été répétées trois fois.

Conclusions.

Ces expériences sur milieux gélosés nous amènent aux conclusions suivantes :

1° *Stichococcus* verdit même dans l'absence complète de lumière, quoiqu'on remarque une légère décoloration ;

2° Il est capable d'assimiler la nourriture du milieu dans l'obscurité, quoique très difficilement;

3° Le développement est très fortement ralenti dans l'obscurité;

4° Le glucose est assimilé dans l'obscurité et il active beaucoup les cultures;

5° Il semble que la légère décoloration de *Stichococcus* dans l'obscurité soit provoquée non pas par le saprophytisme de l'algue, mais par le manque de lumière.

§ 2. Culture sur gélatine.

a) Gélatine dissoute dans la solution de Detmer.

Quatre flacons d'Erlenmeyer renfermant la gélatine nutritive ont été placés dans l'obscurité absolue.

Quatre autres flacons témoins ont été laissés à la lumière.

Nous n'avons plus besoin d'insister sur la marche du développement de *Stichococcus* dans la lumière et sur la gélatine nutritive. Quant aux cultures dans l'obscu-

rité, il se passe un phénomène intéressant. Ce qui frappe tout d'abord l'observateur lorsqu'il examine les cultures placées quelque temps à l'obscurité, *c'est le grand pouvoir liquéfiant de l'algue sur la gélatine.* Dès le commencement, alors que les ménisques sur la gélatine à la lumière peuvent à peine être constatés, dans l'obscurité au contraire, les ménisques sont déjà devenus des cônes assez considérables dont le fond est occupé par les colonies de *Stichococcus*. Cette rapidité de liquéfaction, due à la sécrétion excessive de ferments protéolytiques, continue avec la même intensité et, jusqu'à la fin de l'expérience, nous ne l'avons jamais vue se ralentir.

L'intensité de la teinte chlorophyllienne a diminué encore davantage que sur les milieux gélosés et est devenue presque pâle. Il semble par conséquent que dans ce cas, l'absence de lumière n'est pas l'unique cause de la décoloration de *Stichococcus, mais que la vie saprophytique de cet organisme*, qui digère la gélatine avec une grande avidité, a aussi une influence.

Le développement, quoique considérablement activé par la gélatine, *ne peut jamais être comparé avec celui dans la lumière et sur le même milieu.* Même lorsque l'algue a réussi à liquéfier une assez grande partie de la gélatine et a pratiqué des ménisques très profonds, les colonies restent petites au fond de ces derniers. Pendant toute la durée de l'expérience qui s'est prolongée jusqu'au 1er juillet 1902 et malgré que nous l'ayons répétée trois fois, nous avons constaté toujours le retard des colonies. Lorsqu'à la fin de

l'expérience nous avons mesuré la grandeur des colonies, nous les avons trouvées quatre fois plus petites à l'obscurité qu'à la lumière.

De cette expérience nous pouvons tirer comme conclusion que *Stichococcus,* empêché d'exercer librement sa fonction chlorophyllienne, faute de lumière, augmente son pouvoir liquéfiant dans l'obscurité pour prendre sa nourriture sous une autre forme, organique.

b) Gélatine nutritive glucosée.

A la gélatine nutritive, nous avons ajouté 2 % de glucose. Après la stérilisation, qui doit se faire toujours à la même température, (nous chauffions à 110°) le milieu était distribué dans les flacons. Pour avoir une comparaison complète, nous avons établi trois séries de cultures, comme pour l'expérience sur gélose nutritive glucosée.

Première série : Quatre flacons d'Erlenmeyer contenant la gélatine nutritive glucosée et destinés à être placés à l'obscurité.

Deuxième série : Quatre flacons d'Erlenmeyer contenant la gélatine nutritive sans glucose et destinés également à être placés à l'obscurité.

Troisième série : Quatre flacons d'Erlenmeyer contenant la gélatine nutritive glucosée, pour être placés à la lumière.

Quatrième série : Quatre flacons d'Erlenmeyer contenant la gélatine nutritive non glucosée, pour être placés à la lumière.

Les ensemencements sont faits par piqûres. Les deux premières séries sont immédiatement cachées dans notre boîte spéciale et introduites dans l'obscurité absolue de la chambre noire.

Dans ces conditions d'expérience, qui sont les mêmes que dans le cas précédent, à l'exception du glucose, nous avons obtenu absolument la même dépendance entre la vigueur des colonies et la liquéfaction du milieu d'une part et les conditions de nutrition d'autre part.

Exposons d'abord les résultats pour les deux dernières séries placées toutes deux dans la lumière, mais différant par l'addition de glucose. Les deux phénomènes qui frappent l'observateur, c'est la grande différence qui existe dans le développement et dans la liquéfaction. Ainsi les colonies dans le milieu glucosé sont environ dix fois plus grandes, tandis que la liquéfaction est réduite au minimum. Nous nous sommes déjà suffisamment arrêtés à ce résultat très intéressant dans la première section de ce chapitre pour ne pas avoir besoin d'y revenir ici plus longuement. Quoique ces mesures soient effectuées approximativement, *elles nous montrent tout de même l'influence sur le développement et sur le pouvoir liquéfiant de Stichococcus.* En quelle mesure ce composé hydrocarboné influe-t-il sur la sécrétion du ferment, nous verrons cela dans le chapitre sur le pouvoir liquéfiant.

Que se passe-t-il maintenant dans l'obscurité? Nous savons déjà par l'expérience précédente que l'algue a sécrété avec plus d'intensité le ferment protéolytique

sur le milieu non glucosé. Dans le milieu glucosé s'observe le même phénomène : *la gélatine, qui n'était pas liquéfiée à la lumière, l'est fortement à l'obscurité.* Les deux milieux, ne différant que par l'énergie solaire, nous devons conclure par conséquent que, cette énergie faisant défaut, il y a accélération de la sécrétion à l'obscurité : *l'obscurité favorise la sécrétion protéolytique dans la gélatine glucosée.* Quant au développement sur le même milieu glucosé, il est quatre fois plus faible à l'obscurité qu'à la lumière.

Nous avons comparé les deux séries de cultures dans l'obscurité et nous avons constaté la même différence que dans la lumière. Ces deux séries ayant toutes les conditions identiques, excepté une seule. — le glucose, — *c'est celui-ci qui est la cause soit de l'augmentation du développement, soit de la diminution de la liquéfaction.* La dimension des colonies est environ dix fois plus grande sur la gélatine nutritive glucosée que sur la gélatine nutritive non glucosée. La teinte chlorophyllienne est la même pour les deux milieux, mais l'ayant comparée avec les cultures sur agar dans l'obscurité, nous avons constaté un affaiblissement plus considérable encore de la couleur verte. *Il semble donc que dans ces conditions, le manque de lumière n'est pas l'unique cause de provocation de la chlorose.* Puisque nous avons dit que la teinte est la même dans les deux séries, il est évident que son affaiblissement par rapport aux milieux agarisés dépend non pas du glucose qui n'est présent que dans la première série, *mais bien de la gélatine.* Seulement, *cette influence est facul-*

tative, car, lorsque l'algue est cultivée dans la lumière sur la même gélatine nutritive glucosée, elle peut assimiler l'anhydride carbonique dans des conditions normales et la diminution de teinte n'est pas observée.

Ayant comparé la vigueur des cultures dans les quatre séries, nous avons trouvé qu'elle est la plus grande dans la gélatine nutritive glucosée, placée dans la lumière; vient ensuite le même milieu, dans l'obscurité, puis le milieu non glucosé dans la lumière et enfin le même milieu dans l'obscurité. Il en résulte que l'intensité du développement de *Stichococcus* dans ces conditions dépend de deux facteurs : la richesse du milieu et la lumière, *mais surtout de l'addition de glucose,* qui favorise partout les cultures.

Quant à la liquéfaction, l'ayant comparée dans les quatre séries, nous avons pu voir des relations toutes différentes. Son intensité dépend aussi des deux mêmes facteurs, mais en sens inverse; elle est la plus forte dans le milieu non glucosé et dans l'obscurité; vient ensuite le même milieu dans la lumière, puis le milieu glucosé dans l'obscurité et enfin le même milieu dans la lumière. En d'autres mots, la liquéfaction augmente si la lumière est supprimée et si le milieu est pauvre en substances nutritives.

Deux conclusions principales peuvent être tirées de ces deux comparaisons : 1° *La lumière et le glucose favorisent le développement de Stichococcus;* 2° *la sécrétion est une conséquence du mode de vie de l'algue, elle est un moyen de lutte contre des conditions défavorables.*

Conclusions.

1° *Stichococcus* dissout très fortement la gélatine; 2° cette liquéfaction est favorisée par la pauvreté du milieu et le manque de lumière; 3° La chlorose de *Stichococcus,* lorsqu'il est cultivé sur milieux gélatinisés, dépend non pas seulement de la diminution de la lumière, mais aussi de sa vie saprophytique; 4° Le développement diminue considérablement dans l'obscurité; 5° Lorsque *Stichococcus* est empêché d'exercer librement sa fonction chlorophyllienne, il prend sa nourriture sous une autre forme; 6° Le glucose favorise partout le développement.

Conclusions générales.

De toutes les expériences que nous avons exposées et interprétées dans ce chapitre, voyons quelles conclusions nous pouvons tirer sur la vie de *Stichococcus* vis-à-vis des conditions où il est placé.

Stichococcus ne peut pas supporter les grandes chaleurs, ce qui le rend difficile à cultiver en été.

Le verdissement se fait aussi dans l'obscurité, mais avec un léger affaiblissement qui, sur les milieux agarisés, dépend exclusivement du manque de lumière, tandis que sur les milieux gélatinisés, il est accentué par le concours du saprophytisme de cette algue sur la

gélatine. L'addition de glucose n'a aucune influence sur la décoloration de *Stichococcus*.

La peptone n'a permis, dans aucune de nos expériences, le développement de *Stichococcus;* elle constitue un véritable poison pour cet organisme.

Partout où nous avons ajouté du glucose, les cultures étaient favorisées, le glucose active donc le développement de *Stichococcus*.

Dans l'obscurité le développement de *Stichococcus* est ralenti sur tous les milieux agarisés et gélatinisés.

La sécrétion du ferment protéolytique est provoquée par la pauvreté de nourriture et par le manque de lumière, si l'algue est cultivée dans l'obscurité; tandis que dans la lumière, elle ne dépend que de la pauvreté du milieu. La liquéfaction est donc un moyen de défense.

Ce n'est pas l'azote que *Stichococcus* cherche sous forme organique, mais bien le carbone.

CHAPITRE III

Relations entre le saprophytisme et la nutrition de Protococcus, de Dictyosphærium et des Gonidies de Solorina.

Lorsque nos expériences sur *Stichococcus* furent achevées, nous avons voulu savoir si d'autres algues ne donneraient pas les mêmes résultats au point de vue de leur saprophytisme et des conditions de nutrition qui le provoquent. Les algues choisies furent les suivantes : *Protococcus*, gonidies de *Solorina* et *Dictyosphærium*. Nous avons étudié ces trois organismes surtout au point de vue de l'obscurité. Nous les avons cultivés sur la gélose nutritive non glucosée et glucosée et sur la gélatine nutritive glucosée et non glucosée. Pour *Protococcus*, nous avons expérimenté aussi avec la peptone. Toutes les expériences ont été commencées à la même date et nous eûmes l'occasion de suivre parallèlement le développement de ces organismes et d'établir des résultats tout à fait comparables entre eux. Nous allons les exposer brièvement.

Protococcus sp.

Première expérience.

L'expérience suivante, composée de quatre séries de milieux gélosés, a été commencée le 14 janvier 1903 et terminée le 13 avril.

1re série : 4 flacons d'Erlenmeyer contenant l'agar nutritif non glucosé. 2e série : 4 flacons d'Erlenmeyer contenant l'agar nutritif glucosé.	destinés à être placés à l'obscurité.
3e série : 4 flacons d'Erlenmeyer contenant l'agar nutritif glucosé. 4e série : 4 flacons d'Erlenmeyer contenant l'agar nutritif non glucosé.	destinés à être placés à la lumière.

Les ensemencements dans les quatre séries ont été faits par piqûres.

Protococcus se développe très mal sur les deux milieux non glucosés : il forme de très petites colonies, vertes à la lumière et brunes à l'obscurité, mais de même grandeur dans les deux cas. L'agar nutritif ne convient donc pas à *Protococcus*, même à la lumière.

C'est un phénomène tout différent que nous avons constaté sur l'agar nutritif glucosé (2 %). D'abord, *l'intensité de développement est augmentée considérablement*. Ensuite, comme conséquence de cette vie saprophytique, les colonies sont brunes à l'obscurité et à la lumière ; mais ce phénomène n'a lieu que sur la surface,

tandis qu'à l'intérieur du milieu les colonies sont vertes. Cette décoloration est beaucoup plus prononcée à l'obscurité. Il semble donc qu'elle soit provoquée par le concours de la présence du glucose et de l'absence de lumière lorsque les cultures sont placées dans l'obscurité, et exclusivement par le glucose, lorsqu'elles sont à la lumière. Il en résulte que le glucose est en tout cas un des facteurs qui provoque la chlorose de *Protococcus*. Il faut encore remarquer que, contrairement à ce que nous avons dit pour les milieux non glucosés, le développement ici n'est pas égal dans les deux conditions physiques : *à l'obscurité il est considérablement ralenti*.

Le pigment brun traité par l'iodure de potassium iodé ou par l'acide sulfurique *donne les réactions de l'hématochrome*. Ainsi, par le premier réactif nous avons obtenu un bleu verdâtre ; par le second réactif, nous n'avons pas eu d'action au début, mais au bout d'une demi-heure nous avons obtenu une coloration rouge qui passait ensuite au violet et définitivement au bleu-violet.

Deuxième expérience.

Cette expérience comprend des cultures établies sur des milieux gélatinisés. Elle fut commencée à la même date.

1re série : 4 flacons contiennent la gélatine nutritive non glucosée. 2e série : 4 flacons contiennent la gélatine nutritive glucosée.	destinés à être placés à l'obscurité.

3e série : 4 flacons contiennent la gélatine nutritive glucosée. 4e série : 4 flacons contiennent la gélatine nutritive non glucosée.	destinés à être placés à la lumière.

Voyons ce qui se passe dans la gélatine nutritive non glucosée, à la lumière et à l'obscurité, c'est-à-dire dans les première et quatrième séries. Rappelons d'abord ce que nous avons déjà dit à ce propos pour *Stichococcus*. Nous avons constaté que l'intensité du phénomène de liquéfaction était en raison inverse avec celle de la lumière; c'est-à-dire que dans l'obscurité *Stichococcus* liquéfiait davantage. *C'est le contraire qui a lieu pour Protococcus*. A la lumière, la gélatine est fortement liquéfiée et les dépressions ainsi formées sont remplies de liquide. *Il semble donc que cette algue liquéfie à la lumière davantage de gélatine qu'elle ne peut en utiliser*. Les colonies ayant une densité plus grande que le liquide, restent submergées au fond du ménisque. Elles sont vertes et leur développement est assez fort. *Dans l'obscurité, il est affaibli très sensiblement* de même que la liquéfaction. Les colonies, devenues brunes, ne sont plus couvertes de liquide et se trouvent desséchées au fond du ménisque. *Il semble donc que Protococcus ne liquéfie dans l'obscurité qu'autant de gélatine qu'il lui en faut.*

En augmentant le pouvoir nutritif du milieu de 2 % de glucose, le phénomène devient différent. La liquéfaction est identique à celle qui se passait à la lumière : il y a aussi formation de liquide qui remplit les ménisques et baigne les colonies. Mais, étant donné que *le*

développement est considérablement accéléré et que la quantité de résidu de liquide ne dépasse pas celle qui se trouvait dans le milieu non glucosé et à la lumière, il devient évident que la sécrétion par cellule doit être plus faible. *Le glucose influe donc, pour le diminuer, sur le pouvoir liquéfiant de Protococcus cultivé à la lumière.* Il influe aussi sur la teinte *des colonies qui deviennent brunes.* Il est probable que la liquéfaction de *Protococcus* à la lumière est en relation avec la chlorose ou, ce qui revient au même, avec le saprophytisme accentué par le glucose : *avec l'apparition de la chlorose, la liquéfaction diminue.*

A l'obscurité, le développement et la liquéfaction sont plus faibles. Il n'y a pas de superflu de liquide comme à la lumière. Les colonies sont d'un brun *beaucoup plus foncé.* Il en résulte que ce n'est pas seulement l'addition de glucose qui provoque la chlorose, *mais aussi le manque de lumière* ou la diminution de son intensité, comme nous le verrons plus en détail dans le chapitre sur la liquéfaction.

Ayant comparé les résultats des deux premières séries, nous avons constaté que *le développement est accéléré par le glucose* et que la décoloration est plus forte sur le milieu glucosé. Ainsi se confirme la constatation que nous avons faite à la lumière, c'est-à-dire que le glucose influe aussi sur la décoloration de *Protococcus.*

Cette expérience, comme la première, nous montre que l'obscurité n'est pas favorable au développement de *Protococcus.* Elle nous montre en outre que la

chlorose est le résultat de deux facteurs, et qu'il importe peu de savoir si ces deux facteurs agissent séparément ou en même temps. Ensuite nous voyons que le glucose active partout le développement. Enfin *le pouvoir liquéfiant de cette algue est directement proportionnel avec la lumière* et inversément proportionnel avec la richesse du milieu. A ce dernier point de vue, nous constatons une différence entre *Pleurococcus* et *Stichococcus :* pour ce dernier, la sécrétion était inversément proportionnelle avec la lumière et avec la richesse du milieu.

Nous avons répété trois fois cette expérience, de même que la précédente, et dans tous les cas elle nous a donné les mêmes résultats.

Troisième expérience.

Stichococcus, comme nous l'avons vu, ne préférait pas la vie saprophyte et la peptone lui était un véritable poison. On peut se demander si *Protococcus,* qui passe si facilement à la vie saprophyte, pourrait utiliser la peptone comme aliment complet. Pour résoudre ce problème, nous avons mis en marche l'expérience suivante :

Première série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent la gélatine nutritive, additionnée de 0,5 % de peptone.

Deuxième série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent la gélatine nutritive, additionnée de 0,25 % de peptone.

Troisième série: 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent la gélatine nutritive sans peptone et servent de témoins.

Ces trois séries ont été introduites dans l'obscurité.

Trois autres séries identiques ont été placées à la lumière. Tous les milieux peptonisés étaient soigneusement neutralisés.

Dans les trois premières séries de cultures, placées à l'obscurité, le développement n'est pas le même partout. Il est le plus fort dans le milieu sans peptone et le plus faible dans le milieu à 0,5 % de peptone. *L'intensité du développement diminue donc avec l'augmentation de la richesse du milieu en peptone.* La peptone constituerait ainsi un obstacle pour le développement normal de *Protococcus* dans l'obscurité. Ce résultat, dans ces conditions, nous rappelle celui pour *Stichococcus*, mais ici il y a seulement une différence quantitative et non pas qualitative.

La teinte n'est pas partout la même. Les colonies sont brunes dans la deuxième et la troisième séries (dans la deuxième, plus foncées que dans la troisième), tandis que dans la première série, avec 0,5 % de peptone, elles sont verdâtres.

Le pouvoir liquéfiant est en rapport inverse avec la richesse des milieux en peptone.

De ces observations, nous sommes en droit de conclure que *dans l'obscurité la peptone ne peut point être assimilée par Protococcus*, au contraire même, elle présente un obstacle à son développement.

A la lumière, au contraire, il y a un beau développement dans les trois séries, il est même meilleur dans

les milieux peptonisés, quoique la différence ne soit pas grande et il est le plus fort dans le milieu à 0,5 % de peptone. La teinte verte est conservée partout la même, mais la liquéfaction est en rapport inverse avec la richesse du milieu. Dans les milieux peptonisés, il n'y a point de résidu de liquide et il semble donc que *Protococcus* ne liquéfie qu'autant de gélatine qu'il lui en est nécessaire.

Il devient évident que *Protococcus*, lorsqu'il est placé à la lumière et qu'il peut par conséquent assimiler l'anhydride carbonique de l'atmosphère, *peut aussi utiliser la peptone comme source d'azote.*

Conclusions.

Ayant comparé les résultats des trois expériences, nous pouvons dire qu'il est *probable que le saprophytisme de Protococcus consiste bien plus dans le besoin de prendre le carbone sous une forme hydrocarbonée que d'absorber l'azote sous une forme organique.*

Gonidies de Solorina.

Le 14 janvier 1903, nous avons commencé deux séries d'expériences sur les gonidies de *Solorina:* l'une sur milieux agarisés, l'autre sur milieux gélatinisés. Les deux séries d'expérience ont été terminées le 13 avril 1903.

Première expérience.

1re série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de l'agar nutritif.		placés dans la lumière.
2e série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de l'agar nutritif glucosé (2°/o).		
3e série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de l'agar nutritif glucosé.		placés dans l'obscurité.
4e série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de l'agar nutritif.		

Considérons d'abord les deux premières séries de cultures placées dans la lumière, l'une avec glucose, l'autre sans glucose. Il y a dans les deux séries un beau développement, mais d'intensité différente. Les colonies sur le milieu glucosé sont de beaucoup plus vigoureuses. Donc *les gonidies de Solorina sont aussi favorisées par l'addition de glucose.* Le glucose, en outre, n'exerce aucune influence apparente sur la teinte des colonies. Dans les deux séries, la plante verdit normalement. Cette algue se développe aussi dans l'intérieur du milieu et conserve la même teinte verte.

Les cultures des deux dernières séries placées dans l'obscurité présentent des résultats différents. Les colonies sur l'agar nutritif sont à peine visibles ; elles ne se forment que sur la surface du milieu. Sur le milieu glucosé l'algue se développe très bien. Quant au verdissement, *il est affaibli dans les deux séries et dans le milieu glucosé, les colonies sont devenues pâles sur la surface,* tout en conservant leur couleur verte dans l'intérieur. La décoloration des gonidies de *Solorina*

est le résultat du concours de deux facteurs : le glucose et le manque de lumière.

De la comparaison entre les cultures dans la lumière avec celles dans l'obscurité, nous avons conclu que la lumière et la richesse du milieu en substances nutritives favorisent le développement des gonidies de *Solorina* et que, si ces deux facteurs agissent en même temps, l'algue ne se développe plus dans l'intérieur des milieux agarisés. Pour l'apparition de la chlorose, le manque de lumière suffit, mais elle est poussée plus loin si on ajoute du glucose.

Deuxième expérience.

Disons tout de suite que la gélatine convient beaucoup mieux au développement des gonidies de *Solorina*.

1re série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de la gélatine nutritive. 2e série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de la gélatine nutritive glucosée.	placés dans la lumière.
3e série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de la gélatine nutritive glucosée. 4e série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de la gélatine nutritive.	placés dans l'obscurité.

A la lumière il y a de belles cultures dans les deux milieux, mais elles sont plus vigoureuses dans le milieu glucosé. Il y a aussi développement dans l'intérieur du milieu, mais toujours plus faible qu'à la surface. L'addition de glucose n'a pas d'influence sur la couleur de cette algue : la teinte chlorophyllienne est normale et *reste partout de même intensité.*

A l'obscurité, les résultats changent. Le développement, tout en étant activé par le glucose, *est très diminué. L'obscurité ralentit donc le développement des gonidies de Solorina, même avec du glucose.* La couleur a changé : elle est plus pâle qu'à la lumière et paraît être la même dans les deux milieux ou à peine plus affaiblie dans le milieu glucosé. *La chlorose des colonies, lorsqu'elles sont cultivées sur gélatine, serait donc provoquée exclusivement par le manque de lumière.* Quant à la vie anaréobie de cette algue, elle a lieu également dans l'obscurité.

Au moment où nous terminions l'expérience, nous n'avions pas remarqué que cette algue eût un pouvoir liquéfiant; aucun des milieux, quoique tous gélatinisés, ne montrait le moindre signe de liquéfaction. Mais heureusement, nous n'avons pas jeté les cultures; nous les avons mises de côté pour voir ce qui se passerait ultérieurement. A notre grand étonnement, un mois après la fin de l'expérience, quatre mois après l'inoculation, *nous avons vu apparaître petit à petit la liquéfaction de la gélatine.* La sécrétion du ferment augmenta de plus en plus et au bout du cinquième mois, les colonies s'étaient établies au fond des dépressions devenues à ce moment considérablement larges. Mais ce qui est encore plus intéressant, c'est que *la gélatine n'est liquéfiée que lorsqu'elle est additionnée de glucose.* Les milieux non glucosés, qu'ils soient placés à la lumière ou à l'obscurité, ne sont point liquéfiés. Il en résulte que, contrairement à ce que nous avons constaté pour *Stichococcus* et pour *Protococcus*, *le pouvoir liquéfiant*

des gonidies de Solorina est proportionnel avec la richesse du milieu et ne dépend pas de la lumière.

Cette algue nous apprend qu'il ne faut jamais désespérer des résultats d'une expérience, mais qu'il faut parfois attendre des mois pour arriver à des conclusions intéressantes.

Avec l'apparition de la liquéfaction, les autres phénomènes n'ont en rien modifié leur caractère. Le verdissement et l'intensité du développement restent absolument les mêmes qu'auparavant.

L'expérience fut répétée à l'instant même de l'apparition de la liquéfaction et nous donna les mêmes résultats. Nous n'avons pas serré de près ce phénomène pour voir s'il est ou non en relation avec l'épuisement de la nourriture minérale. C'est pourquoi, n'étant pas en état de donner une explication appuyée sur un assez grand nombre de faits, nous enregistrons ce résultat comme très intéressant, sans le discuter plus à fond.

Dictyosphærium pulchellum Wolle.

Les expériences suivantes sur des milieux agarisés et gélatinisés ont été mises en marche le 14 janvier 1903 et terminées le 13 avril de la même année.

Première expérience.

1re série :	4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de l'agar nutritif.	placés à la lumière.
2e série :	4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de l'agar nutritif glucosé.	

3e série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de l'agar nutritif glucosé.		placés à l'obscurité.
4e série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de l'agar nutritif.		

Dictyosphærium cultivé à la lumière *n'a donné des résultats que sur le milieu glucosé.* Sur ce milieu, il s'est formé de belles colonies d'un vert clair. Cette algue ne peut donc se développer sur l'agar nutritif. Ce dernier résultat est confirmé par les séries établies dans l'obscurité et qui ne nous ont donné aucun résultat positif: *Dictyosphærium* à l'obscurité ne donne le moindre développement, ni sur le milieu non glucosé, ni sur celui avec glucose. Il en résulte que, pour le développement de *Dictyosphærium*, il faut de la nourriture hydrocarbonée et de la lumière, lorsqu'il est cultivé, bien entendu, sur gélose.

Deuxième expérience.

Cette expérience est faite sur des milieux gélatinisés.

1re série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de la gélatine nutritive.	placés dans la lumière.
2e série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de la gélatine nutritive glucosée.	
3e série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de la gélatine nutritive glucosée.	placés dans l'obscurité.
4e série : 4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de la gélatine nutritive.	

Dictyosphærium s'est développé dans ces quatre séries. Il préfère donc la gélatine, mais il n'est pas par-

tout développé avec la même vigueur. L'intensité de son développement dépend dans ces conditions de deux facteurs : *de la lumière et du glucose.* Ainsi, dans la lumière les colonies sont plus volumineuses sur la gélatine glucosée ; de même dans l'obscurité, en général, le développement est plus faible en comparaison de celui qui a lieu dans la lumière, mais il est activé de beaucoup dans le milieu glucosé.

La sécrétion du ferment protéolytique présente aussi des particularités. Dans la lumière, elle a lieu dans les deux séries, mais elle est plus active dans le milieu glucosé. En outre, dans ce dernier milieu toute la gélatine liquéfiée par l'algue n'est pas utilisée par elle, il reste un résidu de liquide qui remplit jusqu'à la moitié les ménisques et baigne les colonies qui sont au fond de ces dépressions. Dans l'obscurité, la gélatine non glucosée n'est pas liquéfiée. L'algue, dans ces conditions, n'attaque donc que le milieu glucosé. Aussi cette liquéfaction est-elle considérablement affaiblie par l'obscurité et la formation d'excès de liquide n'a plus lieu. Comme conclusion, nous pouvons dire que ce phénomène *est en rapport direct avec la richesse du milieu et avec la lumière.*

Dictyosphærium présente le même retard quant à la liquéfaction que les gonidies de *Solorina.* A ce point de vue, ces deux organismes se ressemblent absolument. *C'est aussi après le quatrième mois que nous avons remarqué le commencement de la liquéfaction de la gélatine par Dictyosphærium.* L'expérience étant répétée, nous nous sommes assuré définitivement de l'exactitude de cette observation.

En ce qui concerne la teinte des colonies, elle est verte à la lumière et de même intensité dans les deux séries. Dans l'obscurité, elle est affaiblie sensiblement, mais reste la même dans les deux séries. *L'addition de glucose n'influe donc pas sur l'apparition de la chlorose* qui ne dépend, dans les conditions de notre expérience, que de l'obscurité.

Conclusions sur les trois algues.

De la comparaison des résultats que nous avons obtenus dans nos expériences sur *Protococcus*, les gonidies de *Solorina* et *Dictyosphærium*, il se dégage un certain nombre de conclusions que nous allons exposer.

Nous avons partout constaté que les deux séries de milieux, gélosés et gélatinisés, ne se prêtent pas avec le même avantage aux cultures de ces trois algues. Les milieux gélosés se prêtent mal et sont surtout défavorables pour *Protococcus* et *Dictyosphærium*; tandis que les milieux gélatinisés sont toujours préférés.

A aucun moment, et pour aucune de ces trois plantes, nous n'avons pu constater l'indifférence de la plante vis-à-vis de la lumière et de l'obscurité. Toutes les expériences, sans aucune exception, nous ont donné le même résultat : l'obscurité, dans les conditions de nos expériences, influe toujours sur le développement des trois organismes en question pour le diminuer très considérablement. Ce phénomène est d'une généralité

absolue : il a lieu même lorsque le milieu est additionné de glucose.

Nous savons que, dans la plupart des cas, la vie saprophytique des plantes est suivie d'une décoloration plus ou moins prononcée. Nous avons constaté ce même phénomène dans nos expériences. L'addition de glucose décolore *Protococcus* en pleine lumière. Mais cela n'est pas toujours le cas pour d'autres organismes. Ainsi, nous n'avons jamais constaté le moindre affaiblissement de la teinte verte des gonidies de *Solorina* et de *Dictyosphærium* lorsque, cultivés à la lumière, nous leur ajoutions du glucose. Ces mêmes plantes, cultivées à l'obscurité, donnent, que le milieu soit additionné de glucose ou non, un résultat identique : comme pour le développement, l'obscurité exerce son influence sur l'étiolement de ces plantes pour l'accentuer. Le degré de cette décoloration dépend de l'algue; il semble qu'il soit plus fort si l'organisme passe facilement à la vie saprophytique, comme c'est le cas pour *Protococcus*. Pour les gonidies de *Solorina* et pour *Protococcus*, le glucose exerce parallèlement à l'obscurité une influence sur le degré de la chlorose : le même organisme donne sur le milieu glucosé des colonies plus décolorées. Le glucose paraît n'avoir pas d'influence sur la chlorose de *Dictyosphærium* à l'obscurité.

Dans toutes nos expériences sur les trois algues, l'addition de glucose a une influence bienfaisante pour leur développement qui est activé sur les milieux glucosés, à la lumière comme à l'obscurité.

Toutes ces algues sécrètent des ferments protéoly-

tiques qui, par conséquent, liquéfient la gélatine. Cette sécrétion ne commence pas au même moment pour les trois organismes. *Protococcus* liquéfie dès le début, mais pour les deux autres algues il faut attendre au minimum quatre mois. En outre, *Protococcus*, à la lumière, liquéfie très abondamment la gélatine, que cette dernière soit glucosée ou non, et il paraît liquéfier plus de gélatine qu'il ne lui en est nécessaire. *Dictyosphærium* liquéfie aussi très abondamment la gélatine à la lumière, mais tardivement, et seulement lorsqu'elle est additionnée de glucose ; dans ce milieu aussi, il y a un résidu de liquide qui baigne les colonies; la gélatine sans glucose est liquéfiée moins abondamment; les gonidies de *Solorina* ne liquéfient de gélatine que ce qu'il leur en faut. Dans l'obscurité ce pouvoir s'affaiblit partout. Ainsi *Protococcus* ne donne plus de résidu liquide. *Dictyosphærium* n'en donne pas non plus; la gélatine sans glucose, qui était liquéfiée à la lumière, ne se liquéfie plus dans l'obscurité; les gonidies de *Solorina* ne liquéfient pas même la gélatine glucosée. L'addition de glucose diminue le pouvoir liquéfiant pour *Protococcus* et l'active pour les deux autres algues. De tout ce qui vient d'être dit sur ce phénomène, il ressort que la lumière et le glucose n'agissent pas de la même façon sur les trois algues : la liquéfaction est proportionnelle à la richesse du milieu et à l'éclairement pour *les gonidies de Solorina* et *Dictyosphærium*; *pour Protococcus, il est encore proportionnel à l'éclairement, mais il est en rapport inverse avec la richesse du milieu.*

Il nous paraît possible de conclure que ces trois organismes sont des plantes autophytes, mais qu'elles passent insensiblement à l'état de saprophytes.

*
* *

De la comparaison de ces conclusions avec celles que nous avons tirées de nos recherches sur *Stichococcus*, nous voyons que, quoique ces quatre organismes se comportent différemment vis-à-vis des mêmes conditions, il y a un résultat qui leur est commun, c'est celui énoncé déjà par Chodat et que nous avons rappelé plus haut : « Il est très probable que le saprophytisme des algues, quand il est réalisé, et sans doute celui des phanérogames, comme leur parasitisme, consiste bien plus, sinon exclusivement, dans une dépendance vis-à-vis de l'hôte, quant à la nourriture hydrocarbonée, que dans le besoin d'absorber l'azote sous une forme organique. »

Nous donnons ci-dessous un tableau comparatif pour *Stichococcus*, *Pleurococcus*, les gonidies de *Solorina* et *Dictyosphærium*.

TABLEAU

		STICHOCOCCUS		PROTOCOCCUS	
		LUMIÈRE	OBSCURITÉ	LUMIÈRE	OBSCURITÉ
Milieux nutritifs gélatinisés.	non glucosés.	Le milieu est liquefié. Les colonies sont vivement vertes.	La liquéfaction est plus intense; Les colonies sont 4 fois plus petites et sont presque pâles.	Le milieu est beaucoup plus fortement liquéfié et les dépressions sont remplies de liquide; les colonies st vertes.	La liquéfaction est affaiblie; il n'y a pas de résidu dans les dépressions. Les colonies sont 3-4 fois plus petites et brunisst surtout à la surface.
	glucosés.	La liquéfaction n'est plus observable et par suite l. colonies se forment à la surface en forme de ménisque convexe; les colonies sont vivement vertes.	Le milieu est fortemt liquefié; les colonies sont 4-5 fois plus petites qu'à la lumière. Le verdissemt est atténué.	Le milieu est liquéfié, les colonies sont brunes tant qu'il n'y a pas assez de liquide pr les recouvrir, une fois couvertes ell. restent vertes sous le liquide.	La liquéf. est affaiblie et il n'y a pas de résidu, les colonies st 5-6 fs plus petites qu'à la lumière; brunes à la surface, mais à l'intérieur vert-brunâtre.
Milieux nutritifs agarisés.	non glucosés.	Les colonies sont mieux développées que sur milieu gélatinisé et non glucosé; le verdissement est fort.	Les colonies sont 5-6 fois plus petites qu'à la lumière et sont aussi plus petites que sur milieu gélatinisé; le verdissement est moins intense.	Les colonies sont toutes petites; le verdissement est fort.	Les colonies sont presq. aussi petites qu'à la lumière; elles sont toutes brunes.
	glucosés.	Les colonies favorisées par le glucose sont plus grand. que sur le milieu non gluc. elles sont aussi pl. grandes que sur milieu simpt gélat. le verdist est fort.	Le développement est très affaibli; les colonies sont presque pâles.	Les colonies sont plus grandes que sr milieu non glucosé; à la surface elles sont brun pâle, mais à l'intérieur vertes.	Le développement est aussi activé par le glucose, mais l. colonies st pl. petites qu'à la lumière; la surf. d. colonies est orange, mais leur intr est vert.

Toutes les fois que le milieu est additionné de glucose, que les cultures soient placées à la développement.

COMPARATIF

GONIDIES DE SOLORINA		DICTYOSPHÆRIUM	
LUMIÈRE	OBSCURITÉ	LUMIÈRE	OBSCURITÉ
Le milieu n'est pas liquéfié; le développt a lieu à la surface aussi bien que dn l'int. du milieu; les colonies sont vivement vertes.	Il n'y a pas de liquéf.; du moins elle ne peut pas s'obs. à cause de la petit. des colon. le développt a lieu dn l'int. et sur la surf. du mil. Les col. st moins vertes.	La liquéfaction ne devient observable qu'après le 5me mois; les colonies sont fortement vertes.	La liquéfaction n'a pas lieu, les colonies sont plus petites qu'à la lumière, mais la différence n'est pas très grande; le verdissement est moins intense.
La liquéf. ne devient observ. qu'apres 4 mois le développt a lieu sur la surface et dans l'int. du milieu; le verdissement est fort.	La liquéfac. ne dev. obs. qu'après le 5e mois; les col. sont 5 fois moins fort. qu'à la lum.; le développt a lieu à l'int. et à la surf du milieu; le verdisst est affaibli.	La liquéf. ne devient observable qu'après 5 mois tt le mil. liquéfié n'est pas utilisé par la plante, il rest. un résidu qui baigne les colon.; colon. très vertes.	La liquéf. a également lieu à la même date, mais el. est plus lente; il ne reste point de résidu; les colon. sont plus petites; le verdissement est affaibli.
Le dévelop. est meilleur que sur gélatine non glucosée; l. colonies sont développées à la surf. et dans l'int. du milieu.; le verdissement est fort.	Les colonies st à peine visibles; elles ne se forment que sur la surface du milieu; le verdissement est considérablement atténué.	Il n'y a point de développemt.	Il n'y a point de développemt.
Le dévelop. est plus fort que sur le milieu non glucosé et plus fort aussi que sur gélatine glucosée; les colon. st dévelop. sr la surf. et à l'int. verdissemt fort.	Les colonies st plus petites qu'à la lumière mais sont toujours activées par le glucose; la surface est d'un vert pâle mais l'intérieur est vert.	Colonies assez bien développées; le verdissement est fort.	Il n'y a point de développemt.

lumière ou à l'obscurité, les quatre organismes sont influencés dans leur

CHAPITRE IV

Relations entre le pouvoir liquéfiant et les conditions chimiques et physiques.

Sommaire. — § 1. *Stichococcus. a)* Cultures sur gélatine seule. *b)* Cultures sur gélatine nutritive. *c)* Gélatine nutritive glucosée. § 2. *Protococcus. a)* Cultures sur gélatine seule. *b)* Cultures sur gélatine nutritive. *c)* Cultures sur gélatine nutritive glucosée. — Conclusions.

INTRODUCTION.

Dans les deux chapitres précédents nous avons parlé du phénomène de liquéfaction présenté par les quatre espèces étudiées par nous. Nous avons vu que toutes ces algues dissolvent la gélatine sur laquelle elles sont cultivées. Cette liquéfaction dépendait d'une part de la lumière et d'autre part de la richesse du milieu. Nos expériences nous ont fait reconnaitre que *ce pouvoir est inversément proportionnel à la lumière et à la richesse du milieu pour Stichococcus*, tandis que pour

Protococcus il est encore inversément proportionnel à la richesse du milieu, mais se trouve en rapport direct avec la lumière. Nous rappelons ces détails à propos de ces deux plantes seulement parce que nous ne nous occuperons pas dans ce chapitre des autres espèces étudiées. Ces deux conclusions ont été tirées d'un examen rapide du phénomène de liquéfaction. Restent-elles vraies lorsqu'on cultive *Stichococcus* sur le même milieu gélatinisé, mais en faisant varier la quantité de glucose et l'intensité de la lumière ? C'est ce que nous allons voir ci-dessous.

§ 1. Stichococcus

a) *Cultures sur gélatine seule.*

100 grammes de gélatine sont dissous dans un litre d'eau distillée. Après stérilisation, ce milieu est réparti dans des flacons d'Erlenmeyer. L'expérience suivante a été commencée le 1er novembre 1902.

Quatre flacons d'Erlenmeyer renferment la gélatine destinée aux cultures à la lumière.

Quatre flacons d'Erlenmeyer renferment la gélatine destinée aux cultures à l'obscurité.

La liquéfaction de la gélatine dans les deux séries commence immédiatement. Deux jours sont suffisants pour constater à l'œil nu les dépressions. Ces dernières s'élargissent très rapidement et s'accroissent encore plus vite en profondeur. Au bout d'un mois les

colonies touchent déjà le fond des flacons. Mais quelque rapide qu'elle soit, cette liquéfaction présente toujours une différence très nette à la lumière et à l'obscurité. *Dans ce dernier cas elle est de beaucoup plus rapide.*

b) *Cultures sur gélatine nutritive.*

Le milieu pour cette expérience diffère du premier par le fait qu'à la place de l'eau distillée nous avons pris un litre de solution de Detmer. L'expérience a été mise en marche à la même date.

4 flacons d'Erlenmeyer contiennent de la gélatine nutritive. 4 flacons témoins contiennent de la gélatine seule.	destinés à être placés à la lumière.
4 flacons contiennent de la gélatine nutritive. 4 flacons témoins contiennent de la gélatine seule.	destinés à être placés à l'obscurité.

Nous avons parlé déjà suffisamment des deux premières séries dans le § 2 du chapitre II pour ne pas avoir besoin d'y revenir longuement ici. Disons seulement que les mêmes résultats ont de nouveau été constatés, mais avec une certaine différence d'intensité dont la cause est facile à comprendre :

La première fois, la gélatine étant en proportion de 15 %, était liquéfiée beaucoup plus lentement, maintenant au contraire nous n'en avions mis que 10 %.

Nous avons répété l'expérience avec 15 % de gélatine en comparaison avec une nouvelle série avec 10 % de gélatine, les résultats concordèrent avec notre obser-

vation : *moins le milieu est gélatinisé, plus sa liquéfaction est rapide.* Ce fait s'explique moins par la richesse du milieu que par sa sécheresse, car les cultures sont moins vigoureuses dans le milieu plus concentré et par conséquent moins humide. L'intensité de la liquéfaction dépendrait par conséquent dans ce cas à la fois de la quantité de gélatine et de la richesse du milieu en substances nutritives autres que la gélatine. *Elle est inversément proportionnelle à ces deux facteurs.*

La gélatine dans les deux séries placées à l'obscurité est attaquée plus violemment. Les mêmes précautions doivent être prises en ce qui concerne la concentration de la gélatine. La liquéfaction dépend donc de l'obscurité. Il y a bien une différence quant à la liquéfaction entre les deux séries, comme cela était le cas dans la lumière, mais comparant dans leur ensemble les milieux de ces deux séries avec ceux placés à la lumière nous arrivons à cette remarque générale que la gélatine est plus fortement liquéfiée en l'absence de lumière. Il en résulte donc que *l'obscurité augmente la sécrétion des ferments protéolytiques.* La liquéfaction dépendrait dans ces conditions de trois facteurs : la concentration de la gélatine, la richesse du milieu et l'obscurité.

Dans les conditions de notre expérience tous ces résultats peuvent être exprimés par la loi suivante : *La sécrétion des ferments protéolytiques est inversément proportionnelle à la quantité de gélatine, à la richesse du milieu et à la lumière.*

c) *Cultures sur gélatine nutritive glucosée.*

Nous avons vu déjà que *Stichococcus* cultivé sur la gélatine nutritive glucosée et dans la lumière ne liquéfie pas le milieu ou le liquéfie très faiblement, lorsque le glucose est en proportion de 2 %. Voulant préciser exactement la variation du pouvoir liquéfiant avec la variation de la quantité de glucose, nous ne pouvions pas opérer avec des quantités de glucose supérieures à 2 %. Ayant pris cette quantité comme limite supérieure, nous avons établi douze séries de milieux de moins en moins concentrées en glucose.

Un premier essai où la gélatine était de 15 % nous a donné des résultats très peu satisfaisants. C'est pourquoi nous avons recommencé avec 10 %. Voici les séries de milieux :

1° Quatre flacons d'Erlenmeyer contiennent le milieu avec $^1/_{10}$ % de glucose.

2° Quatre flacons d'Erlenmeyer contiennent le milieu avec $^2/_{10}$ % de glucose.

3° Quatre flacons d'Erlenmeyer contiennent le milieu avec $^3/_{10}$ % de glucose.

4° Quatre flacons d'Erlenmeyer contiennent le milieu avec $^4/_{10}$ % de glucose.

5° Quatre flacons d'Erlenmeyer contiennent le milieu avec $^5/_{10}$ % de glucose.

6° Quatre flacons d'Erlenmeyer contiennent le milieu avec $^6/_{10}$ % de glucose.

7° Quatre flacons d'Erlenmeyer contiennent le milieu avec $^{7}/_{10}$ % de glucose.

8° Quatre flacons d'Erlenmeyer contiennent le milieu avec $^{8}/_{10}$ % de glucose.

9° Quatre flacons d'Erlenmeyer contiennent le milieu avec $^{9}/_{10}$ % de glucose.

10° Quatre flacons d'Erlenmeyer contiennent le milieu avec 1 % de glucose.

11° Quatre flacons d'Erlenmeyer contiennent le milieu avec 1,5 % de glucose.

12° Quatre flacons d'Erlenmeyer contiennent le milieu avec 2 % de glucose.

Ces douze séries étaient toujours accompagnées de deux autres séries témoins, à savoir : Quatre flacons d'Erlenmeyer contenant la gélatine seule et quatre flacons contenant la gélatine nutritive.

Ces quatorze séries étaient préparées en double pour être mises les unes à la lumière et les autres à l'obscurité.

Résultats :

A la lumière. — Le phénomène le plus frappant qui ait attiré notre attention dans ces séries rangées par ordre de concentration de glucose, était la parfaite régularité de l'accélération du développement par le glucose. A partir de la gélatine seule, où les colonies sont le moins favorisées, le développement des algues s'accentue de plus en plus au fur et à mesure que le glucose devient plus abondant. La liquéfaction au contraire va diminuant avec l'augmentation de glucose.

Ainsi, avec $^1/_{10}$ % de glucose, quantité insignifiante, le développement et la liquéfaction changent brusquement : le premier phénomène dans un sens progressif et le deuxième dans le sens contraire. A partir de ce moment la sécrétion continue, toujours en diminuant pour s'arrêter définitivement dans le milieu à $^6/_{10}$ % de glucose. A partir de cette proportion les colonies se forment sur la surface du milieu et non plus dans des dépressions. Cela, il faut bien le remarquer, se passe dans les premiers jours de l'expérience. Deux mois plus tard le même phénomène de liquéfaction commence à avoir lieu dans les autres milieux, mais il est d'une intensité si faible, qu'il est presque insignifiant.

Par conséquent le glucose fourni à l'algue, même en quantité à peine appréciable, dispense l'organisme de la sécrétion protéolytique et lui présente un aliment très favorable. Toutes conditions étant égales d'ailleurs, *la sécrétion dans la lumière ne dépend que du glucose.*

A l'obscurité. — Nous savons déjà que l'obscurité favorise la liquéfaction de la gélatine par *Stichococcus* : cette algue ne pouvant pas assimiler CO^2 de l'atmosphère est forcée de choisir un autre moyen d'existence. Ce phénomène fut constaté ici encore. Les quatorze séries sont liquéfiées incomparablement plus fortement que dans la lumière. La sécrétion de ferment est la plus forte dans la gélatine seule ; elle s'amoindrit dans la gélatine nutritive et diminue brusquement, exactement comme dans la lumière, dès qu'il y a addition de $^1/_{10}$ % de glucose. A partir de ce moment la liquéfaction ne

s'arrête nulle part comme c'était le cas à la lumière : elle continue dans tous les milieux mais en diminuant constamment d'intensité. Dans le dernier milieu, où le glucose est en proportion de 2 %, la liquéfaction est encore très considérable. Nous n'avons pas préparé de milieux plus riches en glucose pour voir où s'arrêterait ce pouvoir liquéfiant, mais les séries avec lesquelles nous avons expérimenté nous prouvent d'une façon absolument claire qu'il diminue au fur et à mesure que le milieu devient plus riche en glucose et nous pouvons être sûr que le moment arrivera où la liquéfaction de la gélatine cessera complètement.

Nous sommes donc en droit d'affirmer que, lorsque *Stichococcus* est cultivé dans la lumière, il utilise le carbone de CO^2 de l'atmosphère et celui de la gélatine à la condition qu'aucune autre substance carbonée ne soit ajoutée au milieu, mais que, si l'on ajoute une quantité donnée de glucose, cette algue n'utilise plus la gélatine et commence à utiliser le carbone sous forme hydrocarbonée, ce qui la dispense d'appliquer ses facultés sécrétrices. Cultivé dans l'obscurité, le même phénomène a lieu, ce qui se confirme par la diminution de la liquéfaction dans les milieux plus riches en glucose, mais, comme une des conditions a changé ici, c'est-à-dire que l'algue est incapable d'assimiler CO^2 de l'atmosphère faute d'énergie lumineuse, elle continuera d'employer encore la gélatine comme source de carbone. C'est pour cette raison sans doute que la gélatine est plus fortement liquéfiée dans l'obscurité.

De ces remarques, nous pouvons tirer la conclusion

que *Stichococcus, outre la fonction chlorophyllienne, sécrète aussi des ferments protéolytiques pour prendre le carbone sous une forme organique quaternaire comme la gélatine, mais que cette sécrétion cesse dès qu'on fournit le carbone organique sous une forme ternaire, par exemple le glucose. En outre, lorsque la lumière est supprimée, l'équilibre étant troublé, l'algue commence à sécréter davantage pour attaquer aussi la gélatine dont la digestion continue tant que le glucose n'est pas en quantité suffisante.*

§ 2. Protococcus.

Cette algue présente des variations extrêmement intéressantes, non pas seulement au point de vue du pouvoir liquéfiant, mais aussi au point de vue de son développement et de la chlorose. Nous l'avons cultivée dans la lumière diffuse ordinaire, dans la lumière diffuse moins claire et dans l'obscurité. Nous entendons par lumière diffuse ordinaire celle qui est réalisée par la première réflexion de la lumière blanche, tandis que la lumière diffuse moins claire serait celle qui est obtenue par la deuxième ou la troisième réflexion des rayons déjà réfléchis. Pour avoir à notre disposition ces deux lumières, nous avons placé nos cultures en dehors de la fenêtre du laboratoire, ce qui nous donnait la lumière diffuse ordinaire, ou en dedans de la fenêtre, ce qui nous procurait la lumière diffuse moins claire.

a) *Cultures sur gélatine seule.*

Le milieu est identique à celui que nous avons employé pour *Stichococcus*. Il est réparti en trois séries comprenant chacune quatre flacons et destinées à être placées dans les différentes lumières. L'expérience a été commencée le 10 décembre 1902.

4 flacons contiennent la gélatine destinée aux cultures à la lumière diffuse normale.

4 flacons contiennent la gélatine destinée aux cultures à la lumière diffuse moins claire.

4 flacons contiennent la gélatine destinée aux cultures à l'obscurité.

La gélatine, dans la première série, est liquéfiée très rapidement dès le commencement de l'expérience. Au bout de quelques jours seulement, les dépressions pratiquées sur le milieu deviennent très larges et sont remplies de liquide, produit de la liquéfaction. Les colonies n'arrivent pas à atteindre de grandes dimensions et restent appliquées au fond des ménisques, inondées par le superflu de liquide. Elles sont normalement vertes.

La deuxième série, quoique placée dans une lumière qui ne diffère pas trop par son intensité de la première, nous a donné néanmoins des résultats tout différents, soit pour la liquéfaction de la gélatine, soit pour le développement et la coloration des colonies. La gélatine est encore liquéfiée, et même assez fortement, mais cette liquéfaction reste inférieure à celle dans la lumière diffuse normale. Il ne se forme plus de résidu

de liquide et il semble que, dans ces conditions, *Protococcus* liquéfie autant de gélatine qu'il lui en est nécessaire. Le développement présente le même caractère, c'est-à-dire que lui aussi, il a diminué d'intensité. Il est approximativement deux fois moins fort que dans la première série. Quant au verdissement, il a subi aussi un affaiblissement ; il commence à être masqué par l'hématochrome dont nous avons déjà parlé : les colonies sont d'un vert jaunâtre.

Toutes les modifications que nous venons de voir obtiennent leur maximum d'intensité dans l'obscurité. La liquéfaction est encore plus considérablement ralentie que dans la deuxième série. Il n'y a pas non plus de liquéfaction superflue. Le développement est encore moins intense et les colonies sont devenues plus jaunes.

Dans ces trois séries de cultures, les conditions chimiques du milieu étant les mêmes, il n'y a que la lumière qui change d'intensité. Il est donc évident que, dans ces conditions la liquéfaction, le développement et la décoloration dépendent exclusivement de la lumière. *Ces trois phénomènes sont inversément proportionnels à l'intensité lumineuse.*

b) *Cultures sur gélatine nutritive.*

4 flacons contiennent la gélatine nutritive destinée aux cultures dans la lumière diffuse normale.

4 flacons contiennent la gélatine nutritive destinée aux cultures dans la lumière moins claire.

4 flacons contiennent la gélatine nutritive destinée aux cultures à l'obscurité.

Parallèlement avec chacune de ces trois séries, nous avions mis 4 flacons témoins, renfermant la gélatine seule.

Avec l'enrichissement de la gélatine en sels minéraux, la liquéfaction n'a pas changé dans la première série; elle est la même que dans la gélatine seule. Le verdissement n'a pas été modifié non plus. Mais le développement est accéléré.

Dans la deuxième série, la liquéfaction dans la gélatine nutritive est moins intense que dans la gélatine seule. Le développement est aussi plus fort dans la gélatine nutritive, mais moins fort qu'à la lumière diffuse normale. Les colonies sont d'un vert jaunâtre.

A l'obscurité, ces phénomènes sont poussés plus loin, comme nous l'avons vu déjà à propos du saprophytisme de *Protococcus*.

De cette expérience, nous concluons que *la richesse du milieu influe, elle aussi, sur la liquéfaction et sur le développement, seulement à la condition que la lumière ne soit pas trop forte.* La richesse du milieu en sels minéraux n'a pas d'influence sur le verdissement.

c) *Cultures sur gélatine nutritive glucosée.*

Les deux premières expériences nous ont montré que la liquéfaction dépend de la lumière et de l'addition de sels minéraux. Nous savons aussi que le glucose dimi-

nue la sécrétion protéolytique. Il nous reste maintenant à exposer le point le plus intéressant de la question, c'est de savoir quelles variations montre la liquéfaction de la gélatine par *Protococcus* lorsqu'on ajoute au milieu du glucose en différentes proportions. L'expérience va nous apprendre que cette variation conserve le même caractère que dans les cas précédents, mais avec une intensité différente. La même expérience nous montrera aussi des résultats très intéressants quant au développement et à la chlorose. Cette dernière est particulièrement digne d'être relevée.

La gélatine nutritive est additionnée de différentes quantités de glucose. L'expérience a commencé à la même date pour toutes les séries de milieux qui ont été mises en observation :

1° 4 flacons contiennent la gélatine nutritive avec 1 % de glucose.

2° 4 flacons contiennent la gélatine nutritive avec 2 % de glucose.

3° 4 flacons contiennent la gélatine nutritive avec 3 % de glucose.

4° 4 flacons contiennent la gélatine nutritive avec 4 % de glucose.

5° 4 flacons contiennent la gélatine nutritive avec 5 % de glucose.

6° 4 flacons contiennent la gélatine nutritive avec 6 % de glucose.

7° 4 flacons contiennent la gélatine nutritive avec 7 % de glucose.

8° 4 flacons contiennent la gélatine nutritive avec 8 % de glucose.

9° 4 flacons contiennent la gélatine nutritive avec 9 % de glucose.

10° 4 flacons contiennent la gélatine nutritive avec 10 % de glucose.

Ces dix séries étaient toujours accompagnées de deux autres séries témoins, à savoir : 4 flacons d'Erlenmeyer contenant la gélatine seule et 4 flacons contenant du Detmer gélatinisé sans glucose.

Résultats :

Lumière diffuse normale. — Nous avons eu déjà l'occasion de constater la liquéfaction abondante de la gélatine nutritive glucosée à 2 % à la lumière. Le phénomène a lieu dans tous les milieux plus riches en glucose. Il semble, comme nous l'avons dit déjà à propos du saprophytisme de *Protococcus*, que cette liquéfaction présente partout la même intensité, mais ce n'est qu'une apparence. Dans tous les milieux glucosés elle est bien la même, parce que le développement est aussi le même, si bien qu'il peut y avoir un complet parallélisme ; mais ce ne serait pas le cas des milieux non glucosés où le développement est moins fort et où pourtant la liquéfaction est la même et par conséquent plus forte pour chaque cellule. Il devient donc évident que, dans ces conditions, la liquéfaction dépend de la richesse du milieu : Elle est ralentie par l'addition de glucose, et, comme son intensité est la même dans le

milieu à 1 % de glucose et dans celui à 10 %, on peut admettre qu'une quantité inférieure à 1 % de glucose donnerait le même résultat. Nous n'avons pas travaillé dans cette direction, mais nous pensons que la série de nos milieux est une garantie suffisante à notre supposition. *Dans la lumière diffuse normale, la liquéfaction est donc affaiblie par le glucose, mais elle ne dépend pas de la quantité de ce sucre qui est additionnée au milieu.*

La chlorose se manifeste très nettement avec l'addition de glucose. Au début, tant que les colonies ne sont pas encore couvertes de liquide, elles sont nettement brunes, mais plus tard, lorsque les ménisques sont suffisamment élargis pour être remplis du superflu de liquide, la couche brune qui couvrait les colonies se détache d'elles et nage à la surface du liquide. Les colonies restent au fond des dépressions sous la masse liquide et ne perdent plus leur teinte verte. *Le glucose provoque donc immédiatement la chlorose de Protococcus, mais à la condition que les colonies restent en contact avec l'air.*

Lumière diffuse moins claire. — Quoique cette lumière ne diffère pas énormément de la précédente, la liquéfaction de la gélatine est excessivement affaiblie et ne peut être observée que jusqu'au milieu contenant 6 % de glucose. A partir du milieu à 7 % de glucose, elle n'a plus lieu. En outre, l'algue ne paraît liquéfier de gélatine que la quantité qui lui en est nécessaire. En comparant ces résultats à ceux obtenus dans la lumière diffuse normale à ce point de vue, nous constatons que,

dans des conditions identiques, où la lumière seule est de moindre intensité, cette dernière condition influe excessivement sur l'affaiblissement de la liquéfaction. Seulement, tandis que dans le premier cas elle était la même dans tous les milieux glucosés, ici *elle diminue avec l'enrichissement du milieu en glucose.*

Le développement est très affaibli, mais, comme dans la lumière diffuse normale, il monte très brusquement avec l'addition de 1 % de glucose. Mais, à partir de ce milieu, au lieu de conserver la même intensité dans tous les autres milieux glucosés, *il s'affaiblit graduellement suivant les différentes quantités de glucose.* Dans le milieu à 10 % de glucose, les colonies présentent la moindre grandeur.

Quant à la chlorose, elle est plus prononcée. Les colonies n'étant plus inondées dans les dépressions, elles restent toujours décolorées. Ici, dans ces conditions, deux facteurs influent sur l'intensité de la décoloration. D'abord, en comparant ces cultures avec celles dans la lumière diffuse normale, nous voyons que les colonies sont plus fortement décolorées. *Le degré d'intensité de la lumière influe donc comme premier facteur sur la chlorose.* Un second facteur *est le glucose :* on peut suivre pas à pas la décoloration successive dans les milieux de plus en plus riches en glucose, et à partir du milieu à 7 % de glucose, les colonies sont devenues tout à fait jaunes.

Obscurité. — Les trois phénomènes : liquéfaction, développement et coloration présentent absolument le même caractère qualitatif que dans les conditions pré-

cédentes, mais diffèrent par leur intensité ; ils sont poussés encore plus loin. La liquéfaction de la gélatine est encore plus considérablement affaiblie : elle *ne se continue que jusqu'au milieu à 3 % de glucose inclusivement. Si le glucose est plus concentré, elle n'a plus lieu.*

Le développement est aussi ralenti et diminue progressivement avec l'augmentation de concentration du glucose. Dans le dernier milieu, les colonies sont très petites.

La chlorose est très fortement prononcée et on observe les colonies colorées différemment. Ainsi, dans les deux premiers milieux non glucosés, elles sont brunes ; dans les milieux glucosés jusqu'à 7 % de glucose, elles deviennent orangées, et enfin dans les autres milieux elles prennent une teinte rouge-orange.

En comparant les résultats obtenus, on voit que la liquéfaction augmente en raison directe de l'intensité de la lumière ; dans la lumière diffuse normale, la quantité de glucose n'a pas d'influence sur cette faculté, mais dès que la lumière diminue d'intensité, le glucose devient régulateur de la liquéfaction, il la fait diminuer dans les milieux riches en glucose et l'arrête complètement à partir d'un certain moment. La même dépendance existe pour le développement et la chlorose. Ces trois phénomènes dépendent donc à la fois de la lumière et du glucose.

Conclusions.

L'addition de glucose influe sur le pouvoir liquéfiant de *Stichococcus* et de *Protococcus* ; ce pouvoir est très fortement ralenti pour les deux algues.

L'intensité de la lumière agit tout autrement. Pour *Stichococcus*, la liquéfaction est accélérée dans l'obscurité, tandis que pour *Protococcus*, elle est diminuée.

La chlorose de *Protococcus* est immédiatement provoquée par l'addition de glucose et elle est encore accentuée par la diminution de la lumière. Dans l'obscurité, elle dépend encore de la quantité de glucose : plus il y a de glucose, plus les colonies sont décolorées. Pour *Stichococcus*, le verdissement paraît dépendre de l'intensité de la lumière, avec laquelle il est en rapport inverse.

La liquéfaction de la gélatine par *Stichococcus* est déterminée exclusivement par la nécessité de prendre le carbone sous une forme organique ; lorsque cette nécessité est satisfaite par la présence de glucose, la liquéfaction s'arrête complètement à la lumière ; à l'obscurité, au contraire, l'algue étant privée de la fonction chlorophyllienne, elle utilise aussi la gélatine, si bien que la sécrétion du ferment protéolytique recommence. La sécrétion de *Protococcus* a lieu à la lumière ou, pour mieux dire, c'est une fonction nor-

male pour cette algue lorsque la lumière est suffisamment forte, mais elle est empêchée lorsqu'on change l'intensité lumineuse ou qu'on ajoute du glucose au milieu [1].

[1] Ce travail était déjà à l'impression quand parut l'intéressant mémoire d'Artari (Pringsheim's Jahrbücher 1904, Heft 4) sur l'influence de la concentration des solutions nutritives sur quelques algues vertes. Nous n'avons donc pas pu en tenir compte.

ERRATUM

Page 50, lire en note :

[1] Artari, l. c. Berichte d. d. bot. Ges.

au lieu de :

Unters. über Entw. u. Syst. einiger Protococcoideen. Bull. Soc. Imp. des Sc. nat. Moscou.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

ARTARI, A. *Untersuchungen über Entwicklung u. Systematik einiger Protococcoiden.* Bull. Soc. Imp. des Natur. de Moscou. N° 2, 1892.

— *Ueber die Entwick. d. grünen Algen unter Ausschluss d. Beding. d. CO_2-Assimil.* Bull. Soc. Imp. des Natur. d. Moscou. N° 1, 1899.

— Berichte. d. d. bot. Gesellsch., XIX. 1901, et XX. 1902, p. 201.

BENECKE. Bot. Centrbl., 1894, p. 195. — Jhrb. f. Wiss. Bot.. 1895, p. 487. — Bot. Zeitung., 1896, p. 97.

BEYERINCK, M. W. *Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichengonidien, etc.* Bot. Zeitung. N° 45, 1890.

BOKORNY. Biolog. Centralbl.. XVII, N° 12, 1897.

CHARPENTIER, P.-G. *Recherches sur la physiologie d'une Algue verte.* Ann. Inst. Pasteur. XVII, 5, 1903.

CHODAT. R. et GOLDFLUS, M. *Note sur la culture des Cyanophycées.* Bull. Herb. Boiss., 1897.

CHODAT R. et GRINTZESCO, J. *Sur les méthodes de cultures pures des algues vertes.* — C. R. Congrès intern. d. Bot. de Paris, 1900.

CHODAT, R. et ADJAROFF, M. *Conditions de nutrition de quelques algues en cultures pures.* Arch. des Sc. phys. et nat., Genève, 1903, Mars.

CHODAT, R. *Des conditions déterminant le parasitisme chez les algues*. Bull. Herb. Boiss., 1903.

DETMER. *Pflanzenphysiolog. Prakticum*. 2. Auslage, 1895.

FAMINTZIN. Mélanges biol. d. l'Acad. Imp. des Sc. de St-Pétersb. XIII, 1871.

MATRUCHOT, L. et MOLLIARD, M. *Variations de structure d'une algue verte sous l'influence du milieu nutritif*. Rev. Gén. de Bot., 1902.

MOLISCH. Sitzungsberichte d. Wien. Akad., 1895, Bd. 104, I, p. 799. — Ibid., 1896, Bd. 105, I, p. 633.

GRINTZESCO, J. Bull. Herb. Boissier, 1902. (*Scenedesmus acutus Meyen.*) — Rev. Gén. d. Bot. 1903. (*Chlorella vulgaris Beyer.*)

PFEFFER. *Pflanzenphysiologie*.

RADAIS, R. *Sur la culture d'une algue verte. Formation de Chlorophylle à l'obscurité*. C. R. Acad. des Sc. de Paris. 1900.

— *Sur la culture des algues à l'état de pureté*. C. R. Congrès intern. d. Bot. Paris 1900.

RICHTER. *Anpassung d. Süsswasseralgen an Kochsalzlösungen* 1892.

ZALESKY. Berichte d. d. Bot. Gesellsch., 1897.

---

13 1914